

Vergleichende Untersuchungen
über die Lymphozytenproliferation
nach Stimulation mit den Lektinen
Phytohämagglutinin, Concanavalin A
und Pokeweed Mitogen
bei Gesunden und Kindern
mit verschiedenen Erkrankungen

Angelika Tietze

1402

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Betke

Vergleichende Untersuchungen über die Lymphozytenpro-
liferation nach Stimulation mit den Lektinen Phytohä-
magglutinin, Concanavalin A und Pokeweed Mitogen bei Ge-
sunden und Kindern mit verschiedenen Erkrankungen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Tietze

aus
München
1982



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Eife
Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4. 11. 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Lektine	2
2.1 Allgemeines	2
2.2 Struktur (und Wirkung) der Lektine PHA, Con A und PWM	5
3. Probanden und Materialien	9
3.1 Untersuchte Personen	9
3.2 Materialien	10
4. Methodik	11
4.1 Gewinnung und Kultivierung von Leukozyten	11
4.1.1 Leukozyten-Suspensionen	11
4.1.2 Leukozyten-Kulturen	11
4.2 Lymphozyten-Stimulation	12
4.3 Spontane DNS-Synthese	13
4.4 Blastentransformation	13
4.5 Berechnung der Stimulationsquotienten	13
5. Ergebnisse	15
5.1 Stimulationsquotienten bei Patienten und Gesunden	15
5.1.1 PHA/Con A-Quotient	15
5.1.2 PHA/PWM-Quotient	20
5.1.3 Con A/PWM-Quotient	25
5.2 Stimulationsquotienten bei bestimmten Personengruppen	33
5.2.1 Stimulationsquotienten bei Gesunden	33
5.2.2 Stimulationsquotienten bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie	35
5.2.3 Stimulationsquotienten bei Patienten mit Zöliakie	41
5.3 Stimulationsquotienten bei einzelnen Probanden	45
6. Diskussion	53
7. Zusammenfassung	68

1. Einleitung

Die Stimulation von Lymphozyten durch Lektine und die Messung der induzierten Lymphoproliferation gehört zu den bereits klassischen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der zellulären Immunkompetenz eines Patienten. Das bekannteste und am häufigsten zur Stimulation verwendete Lektin ist das Phytohämagglutinin (PHA), jedoch eignen sich auch eine Reihe weiterer Substanzen zur unspezifischen, d.h. keine vorhergehende Sensibilisierung erfordernde Lymphozyten-Stimulation. In den siebziger Jahren erschienen zahlreiche Veröffentlichungen über Beobachtungen (zumeist an Maus-Lymphozyten), daß die verschiedenen Lektine unterschiedliche Lymphozyten-Populationen stimulieren (Literatur in Kap. 6). In den meisten dieser Veröffentlichungen wurde die Wirkung der Pflanzenextrakte Concanavalin A (Con A) oder Pokeweed Mitogen (PWM) mit der des PHA auf verschiedene Lymphozyten-Populationen verglichen. Aus klinisch-immunologischer Sicht ergab sich aus diesen Beobachtungen die Frage, ob die gleichzeitige Verwendung verschiedener Lektine zur Lymphozyten-Stimulation eine umfassendere (zelluläre) Immundiagnostik ermöglicht als die Verwendung nur eines Lektins.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb festzustellen, welche Unterschiede in den Reaktionen normaler Lymphozyten auf die drei Lektine (PHA, Con A und PWM) bestehen und ob eventuelle Unterschiede regelmäßig bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen auftreten.

2. Lektine

2.1. Allgemeines

2.1.1 Definition

Die in dieser Arbeit zur Lymphozytenstimulation verwendeten Mitogene PHA, Con A und PWM gehören zu den Lektinen (1,2). Lektine sind Proteine, die Zellen agglutinieren können, indem sie mit bestimmten Kohlenhydraten der Zelloberflächen reagieren (1). Soweit diese Proteine pflanzlichen Ursprungs sind, wurden sie auch Phytohämagglutinine genannt (2). In dieser Arbeit wird jedoch, wie heute allgemein üblich, nur ein Extrakt aus der Bohne *Phaseolus vulgaris* als Phytohämagglutinin bezeichnet.

2.1.2 Vorkommen

Die am besten untersuchten Lektine werden aus den Samen bestimmter Bohnen extrahiert (PHA aus *Phaseolus vulgaris* und Con A aus *Concanavalia ensiformis*) oder aus den Samen anderer Pflanzen z.B. Weizen. Aber auch andere Pflanzenteile enthalten Lektine: PWM wird aus den Wurzeln, den Beeren oder aus den Blättern der Kermesbeere (*Phytolacca americana*) gewonnen. Außerdem wurden Lektine in verschiedenen Mikroorganismen (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) (3) und niederen Tieren (Schnecken, Aale) (4,5) gefunden. In jüngster Zeit wurden Lektine auch in der Leber von Säugetieren (6) und in den Membranen von Lymphozyten (7) und Makrophagen (8) entdeckt.

2.1.3 Eigenschaften und Anwendung

Neben der Agglutination von Zellen haben Lektine zahlreiche weitere Eigenschaften:

2.1.3.1 Mitogene Wirkung

Einige Lektine können Lymphozyten zur Blastentransformation und DNS-Synthese stimulieren. Über die Reaktion von Lymphozyten auf diese drei Lektine wurden umfangreiche Untersuchungen veröffentlicht (9-18) von deren

Ergebnissen hier einige wesentliche genannt sein sollen:

Wenn Lektin-Moleküle an die Zellmembran gebunden sind, kommt es zur Steigerung von Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel in der Zelle und auch zur Replikation von DNS (Anwendung zur Chromosomenanalyse).

PHA, Con A und PWM stimulieren verschiedene Lymphozyten-Populationen (Genaueres darüber mit Literaturangaben siehe Kapitel 6). Hier sei nur kurz zusammengefaßt, daß nach heute allgemein gültiger Meinung durch PHA und Con A vorwiegend T-Lymphozyten, durch PWM sowohl T- wie auch B-Lymphozyten stimuliert werden. Dies trifft jedoch nur für lösliche Mitogene und gereinigte B- bzw. T-Zellkulturen zu, denn bei Verwendung von gebundenem Mitogen oder von Mischzellkulturen können auch PHA und Con A eine Blastentransformation an B-Zellen induzieren. Ferner wurden innerhalb der T-Lymphozyten weitere Subpopulationen gefunden, die sich durch PHA, Con A und PWM unterschiedlich gut stimulieren lassen.

Interessanterweise ist bei allen Lektinen die gleiche Menge der Substanz an die einzelne Zelle gebunden. Die stärkste mitogene Wirkung wird erreicht, wenn etwa 5 % der maximal möglichen Menge Lektin an die Zellmembran gebunden ist. Ferner hängt die Wirksamkeit des Mitogens von der Anzahl der Monomere ab, aus denen sich das Molekül zusammensetzt. Da ungelöste oder an einen Träger gebundene Lektine die gleiche Aktivität wie gelöste zeigen, kann man schließen, daß Lektine eine Blastentransformation induzieren, ohne in die Zelle einzudringen.

2.1.3.2 Weitere Wirkungen

Außer zur Lymphozytenstimulation dienen Lektine auch einer Reihe von anderen Zwecken:

Zellagglutination. Gemäß ihrer Definition können Lektine zur Agglutination verschiedener menschlicher, tierischer oder pflanzlicher Zellen verwendet werden, z.B. eignen sich einige Lektine zur Blutgruppenbestimmung (5, 19, 20).

Antimitogener Effekt. Neben ihrer mitogenen können Lektine auch eine antimitogene Wirkung haben, z.B. hemmt Con A das Wachstum von Krebszellen in vivo und in vitro (21, 22, 23).

Immunsuppressiver Effekt. Eine intraperitoneale Injektion von Con A zwei Tage vor der Erstinjektion eines thymus-abhängigen Antigens unterdrückt bei erwachsenen Mäusen die Antikörperbildung gegen das betreffende Antigen (24).

Ferner können Lektine verwendet werden zur Darstellung von Strukturveränderungen an Zellmembranen, zur Reinigung von Kohlenhydratverbindungen mit Hilfe der Affinitätschromatographie und zu Strukturanalysen von Kohlenhydraten.

Über die Funktionen der bei Säugetieren gefundenen Lektine ist noch wenig bekannt. Das am besten erforschte Säugetierlektin, das "hepatic binding glycoprotein", wirkt bei der Beseitigung von defekten Serumglykoproteinen und möglicherweise auch von Erythrozyten aus dem Blut mit. Ferner ist es mitogen für menschliche periphere Lymphozyten, die mit dem Enzym Neuraminidase vorbehandelt wurden (6). Die in den Membranen von Lymphozyten (7) und Makrophagen (8) entdeckten Lektine sind vermutlich an Makrophagen-Lymphozyten-Interaktionen beteiligt.

2.2. Struktur (und Wirkung) der Lektine PHA, Con A und PWM

2.2.1 PHA

PHA wird aus den Samen der Bohne *Phaseolus vulgaris* extrahiert. Je nach Verwendungszweck werden zur Gewinnung verschiedene Reinigungsverfahren durchgeführt. Wir haben hier das nach der Methode von Rigas und Osgood (25) teilweise gereinigte PHA-P der Difco Laboratories zur Lymphozytenstimulation verwendet. Es weist bei der Acrylamid-Gelelektrophorese mindestens 17 Banden auf. Da jedoch für andere Arten von Experimenten, z.B. für solche, die den Wirkungsmechanismus aufdecken sollen, oder die eine Injektion in Tiere mit sich bringen, möglichst hochgereinigte Präparationen notwendig sind, wurde viel Mühe auf die Reinigung des mitogenen Grundstoffs verwendet. Weber (26) und Allan et al. (27) trennten 1969 chromatographisch zwei verschiedene Fraktionen: PHA-L, das nur mitogene Wirkung besitzt und ein Tetramer aus vier mitogenen Untereinheiten ist; PHA-H, ein Gemisch aus drei verwandten Proteinen,

die in verschiedenen Verhältnissen mitogene und hämagglutinierende Wirkung besitzen (18). Jedes dieser drei Proteine ist ein Tetramer, das sich aus L- und H-Untereinheiten zusammensetzt (L_3H ; L_2H_2 ; LH_3). Die L-Untereinheit ist Träger der mitogenen, die H-Untereinheit Träger der hämagglutinierenden Wirkung.

Sowohl PHA-H als auch PHA-L haben ein Molekulargewicht von 128.000 (das Molekulargewicht der H- und der L-Untereinheit beträgt 32.000). Die Aminosäurezusammensetzung weist einige Besonderheiten auf. Cystein ist nicht enthalten, Aminosäuren mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen, insbesondere Asparaginsäure, kommen ungewöhnlich häufig vor.

Miller et al. bestimmten 1973 (12) die Aminosäuresequenz am Stickstoffende der mitogenen und der hämagglutinierenden Untereinheit. Sie unterscheidet sich in 6 der ersten 7 Aminosäurereste; die Reste 8 bis 24 (weiter wurde nicht untersucht) sind identisch. Die erste Aminosäure am N-Ende ist bei der L-Untereinheit Serin, bei der H-Untereinheit Manin. Beide Untereinheiten enthalten 6,6 % Kohlenhydrate, hauptsächlich Mannose und Glucosamin, und sehr geringe Mengen an Ca^{++} und Mg^{++} .

Jedes Tetramer besitzt vier Bindungsstellen für Saccharide.

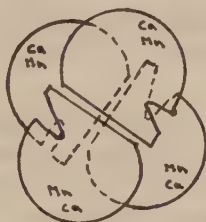
2.2.2 Con A

Con A, das am genauesten untersuchte Lektin, wird aus den Samen der Bohne *Concanavalia ensiformis* gewonnen. Es agglutiniert Erythrozyten von Ratten, Pferden, Hunden und Katzen; bei menschlichen Erythrozyten ist die agglutinierende Wirkung nur sehr gering. Ferner bildet es mit einer Reihe von Polysacchariden (28,29) und Glykoproteinen (30) unlösliche Komplexe und stimuliert Lymphozyten zur Blastentransformation (31). Zur Zeit besteht ein großes Interesse für Con A,

weil es gewisse transformierte, maligne Zellen agglutinieren kann, während es die normalen Zelllinien nicht agglutiniert, von denen diese malignen Zellen abstammen (32, 33).

Con A kann verhältnismäßig leicht mit Hilfe der Affinitätschromatographie auf Sephadex^R gereinigt werden (34,35).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Lektinen enthält es keine Kohlenhydrate (34,35). Bei einem pH-Wert von 7,0 - 7,5 liegt ConA hauptsächlich als ein Tetramer vor, das aus vier gleichen Untereinheiten gebildet wird (36, 37); sinkt der pH-Wert unter 6,0, dissoziiert das Molekül zu Dimeren (38). Das Molekulargewicht des Tetramers beträgt 102.000 (38).



Die Sequenz der 238 Aminosäuren des Monomers und seine Tertiärstruktur sind bekannt (39). Wie in den meisten pflanzlichen Lektinen sind viele Aminosäurereste mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen (Asparaginsäure, Serin, Threonin) aber nur wenig schwefelhaltige Aminosäuren enthalten (2 Methioninreste, kein Cystein). Die Hauptstrukturelemente eines Monomers sind zwei antiparallele Faltblattstrukturen, die in etwa aufeinander senkrecht stehen; α -Helix wurde nur sehr wenig gefunden. Jedes Monomer enthält eine Saccharidbindungsstelle(40), ein

Calciumion und ein Übergangsmetallion, in der Regel Mn^{++} (41). Obwohl die beiden Ionen über 20 Å von der Saccharidbindungsstelle entfernt sind (39), sind sie für die Bindung eines Kohlenhydratrestes erforderlich (42). Es werden nur Pyranosen mit einer bestimmten Stellung der OH-Gruppen in den Positionen C₃, C₄ und C₆ gebunden; diese Stellung liegt bei D-Glucopyranose und bei D-Mannopyranose vor (20). Die α-Formen dieser beiden Zucker werden fester als die entsprechenden β-Formen gebunden (29).

In den meisten ConA-Präparationen ist ein Teil der Untereinheiten in zwei Fragmente mit den Molekulargewichten 13.000 und 11.000 gespalten. Dies hat jedoch offensichtlich keine Auswirkungen auf die biologischen Eigenschaften (43).

2.2.3 PWM

PWM wird gewöhnlich aus den Wurzeln der Kermesbeere (*Phytolacca americana*) gewonnen, ist aber auch in den Beeren, den Blättern und im Stengel dieser Pflanze enthalten. Im Gegensatz zu den beiden oben beschriebenen Lektinen stimuliert es nicht nur T-, sondern auch B-Lymphozyten und hat nur eine geringe hämagglutinierende Wirkung. Vor seiner Entdeckung als Mitogen durch Farnes et al. 1964 (44) war es nicht als Lektin bekannt.

Mit Hilfe eines komplexen Verfahrens wurde PWM von Reisfeld et al. 1967 (45) bis zur Homogenität gereinigt.

Es besteht aus einer einfachen Glykoproteinkette mit einem Kohlenhydratanteil von etwa 5 % und hat ein Molekulargewicht von 32.000. Das PWM-Molekül enthält 66 Cysteinreste, d.h. der Cysteinanteil beträgt 20 %.

Die SH-Gruppen der Cysteinreste bilden 33 Disulfidbrücken und bedingen dadurch die ziemlich starre Struktur des Moleküls. Auch Glycin, Asparaginsäure und Glutaminsäure kommen verhältnismäßig häufig vor; Methionin konnte nicht gefunden werden. PWM unterscheidet sich also nicht nur durch seine Wirkung, sondern auch durch seine Aminosäurezusammensetzung erheblich von PHA und ConA.

3. Probanden und Materialien

3.1. Untersuchte Personen

Untersucht wurden a) Patienten mit verschiedenen immunologischen und nicht-immunologischen Erkrankungen (s. Tab. 5.2) b) Angehörige der Patienten und c) "Kontrollpersonen"; das sind Personen, die klinisch gesund erschienen und mit den Patienten nicht verwandt waren. Klinisch gesunde Angehörige der Patienten (Gruppe b) wurden als eigene Gruppe behandelt, um mögliche, genetisch vorhandene, klinisch aber nicht evidente Immundefizienzen auszuschließen.

Ein Teil der insgesamt 547 Personen wurde wiederholt untersucht, insgesamt konnten 678 Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden .

Von den 547 Probanden der gesamten Studie wurden

	478 Personen	1 x	
	46 "	2 x	
	10 "	3 x	
	5 "	4 x	
	4 "	5 x	
	1 Person	6 x	
	1 "	7 x	
	1 "	11 x	
und	1 "	14 x	untersucht.

51 Kontrollpersonen (Gruppe c) wurden insgesamt 91 mal untersucht.

Davon wurden	34 Personen	1 x	
	9 "	2 x	
	5 "	3 x	
	2 "	5 x	
und	1 Person	14 x	untersucht.

3.2 Materialien

In den Versuchen wurden folgende Präparate verwendet: Medium RPMI 1640, Penicillin G und Streptomycin (GIBCO, Glasgow); Glutamin (FLOW, Bonn); Humanserum (Blutbank des Bayerischen Roten Kreuzes München); Heparin 5000 E/ml (Apotheke der Klinischen Universitätsanstalten, München); 6-3H-Thymidin spez. Aktivität 5 mCi/mM (Amersham Buchler, Braunschweig); Dextran 200.000-300.000 MG (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala); Toluol (Merck, Darmstadt); 2,5-Diphenyl-oxazol "PPO" (Koch-Light-Laboratories Ltd. Coinbrocks, Bucks); Polystyrol-Teströhrchen 12x75 mm (Falcon Plastics, Oxnard); Zellulose-Acetat-Membranfilter Nr. 111-06025 (Sartorius, Göttingen).

Die zur Lymphozyten-Stimulation verwendeten Präparate werden in Abschnitt 4.2 beschrieben.

Zubereitung bestimmter Präparate:

Dextran wurde mit physiologischer Kochsalz-Lösung zu einer 6 %-igen Lösung zubereitet.

6-3H-Thymidin (3-H-TdR), spez. Aktivität 5mCi/mmol, wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Präparation nochmals 1:10 verdünnt mit Medium RPMI 1640 (für Leukozyten-Kulturen).

Der Szintillator wurde aus Toluol unter Zugabe von 5 g/l PPO hergestellt.

Kulturmedium RPMI 1640 war zusammengesetzt aus Medium RPMI 1640, angereichert mit Humanserum (10 %), 0,04 mM/ml Glutamin, 100 E/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin. Dieses Medium wurde für Leukozyten-Kulturen verwendet.

4 Methodik

Das Prinzip der in dieser Arbeit angewandten Methode besteht darin, daß Lymphozyten in Suspensions-Kulturen stimuliert werden und die auf die Stimulation hin erfolgende Blastentransformation (Proliferation), gemessen wird. Außerdem wurde in unstimulierten Kulturen die spontane Zellproliferation bestimmt.

4.1. Gewinnung und Kultivierung von Leukozyten

4.1.1 Leukozyten-Suspensionen

Venöses Blut von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde heparinisiert (0,02 ml Heparin/ml), zur beschleunigten Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten mit 6 %igem Dextran (1 Teil Dextran auf 4 Teile Blut) gemischt und dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Sedimentation der Erythrozyten wurde das Plasma mit den Leukozyten abgehoben und bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Leukozyten-freie Plasma/Dextran-Gemisch wurde verworfen und die im Bodensatz befindlichen Zellen in Medium RPMI 1640 suspendiert, bei 40 g zentrifugiert und je nach dem Ausgangsvolumen des Blutes in 2-5 ml Medium RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden dann gezählt und differenziert nach mono- und polynukleären Zellen.

4.1.2 Leukozyten-Kulturen

Aus den Leukozyten-Suspensionen wurden durch Zugabe von Kulturmedium 1640 Zellsuspensionen mit $1,3 \times 10^5$ Lymphozyten pro ml hergestellt und je 1,5 ml dieser Suspensionen in 12x75 mm Kulturröhrchen gegeben. Die Kulturen enthielten dann 200.000 Lymphozyten und - je nach Patient bzw. Kontrollperson - einen unterschiedlichen Anteil von Granulozyten (etwa zwischen 200.000 und 800.000 pro Kultur), der abhängig war vom Differentialblutbild des Probanden.

4.2 Lymphozyten-Stimulation

Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte mit

a) Phytohämagglutinin

100 mg Bacto-Phytohämagglutinin-P (PHA) (DIFCO, Detroit) wurden in 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst und Serien-Verdünnungen hergestellt. Leukozyten-Kulturen wurden mit 100 µl der Verdünnungen 1:40, 1:80 und 1:320 (Endkonzentration pro 1,5 ml-Kultur: 50, 25 und 6,25 µg PHA) für 3 Tage stimuliert.

b) Concanavalin A

100 mg Concanavalin A (Con A) (Sigma Chemical Company, St. Louis) wurden in 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst und Serien-verdünnungen hergestellt. Leukozyten-Kulturen wurden mit 100 µl der Verdünnungen 1:32 (Endkonzentration pro 1,5 ml-Kultur: 62,5 µg ConA) für 3 Tage stimuliert.

c) Pokeweed Mitogen

100 mg Pokeweed Mitogen (PWM) (GIBCO, Glasgow) wurden in 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst und Serien-Verdünnungen hergestellt. Leukozyten-Kulturen wurden mit 100 µl der Verdünnung 1:4 (Endkonzentration pro 1,5 ml-Kultur: 0,5 mg PWM) für 3 Tage stimuliert.

4.3 Spontane DNS-Synthese (3H-Thymidin-Einbau)

In nicht-stimulierten Kulturen von Leukozyten Gesunder wird nur eine geringe Menge 3H-Thymidins in die DNS der Zellen eingebaut ("spontane 3H-Thymidin-Aufnahme"). Nach dreitägiger Inkubation findet man unter den oben angegebenen Kulturbedingungen bei Gesunden in der Regel Werte unter 1000 cpm (s.u.).

4.4 Blastentransformation

Nach der Inkubation wurde den Leukozyten-Kulturen 1,0 μ Ci 3H-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere drei Stunden inkubiert. Die Inkorporation des 3H-Thymidins in die DNS der Zellen wurde durch Abkühlen der Kulturen auf 0°C gestoppt und die Zellen mit physiologischer Kochsalz-Lösung auf Zellulose-Azetat-Filter gewaschen. Die Filter wurden mit Trichloressigsäure und Äthylalkohol gewaschen, getrocknet und ihre Radioaktivität mittels Szintillationsspektrometrie bestimmt.

Gemessen wurden die Counts pro Minute (cpm) 3H-Thymidin-Aufnahme in stimulierten und in nicht-stimulierten Kulturen und die Differenz beider Werte als Maß für die Stärke der Blastentransformation angesehen.

4.5 Berechnung der Stimulations-Quotienten

Aus der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme, die mit den drei Mitogenen induziert wurden, wurden drei Quotienten berechnet:

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. der PHA/Con A Quotient | $\bar{x}$ cpm PHA / $\bar{x}$ cpm Con A |
| 2. der PHA/PWM Quotient | $\bar{x}$ cpm PHA / $\bar{x}$ cpm PWM |
| 3. der Con A/PWM Quotient | $\bar{x}$ cpm Con A / $\bar{x}$ cpm PWM |

Der $\bar{x}$ -cpm PHA-Wert gibt die mittlere 3H-TdR-Aufnahme an, die sich bei Berücksichtigung von je Dreifach-Kulturen nach Stimulation mit 3 Dosen (insgesamt also 9 Werte) berechnet.

Der $\bar{x}$ -cpm Con A-Wert gibt die mittlere 3H-TdR-Aufnahme in Dreifach-Kulturen an.

Der $\bar{x}$ -cpm PWM-Wert gibt ebenfalls die mittlere 3H-TdR-Aufnahme in Dreifach-Kulturen an.

5. Ergebnisse

5.1. Stimulationsquotienten bei Patienten und Gesunden

5.1.1 PHA/Con A-Quotient

N o r m b e r e i c h

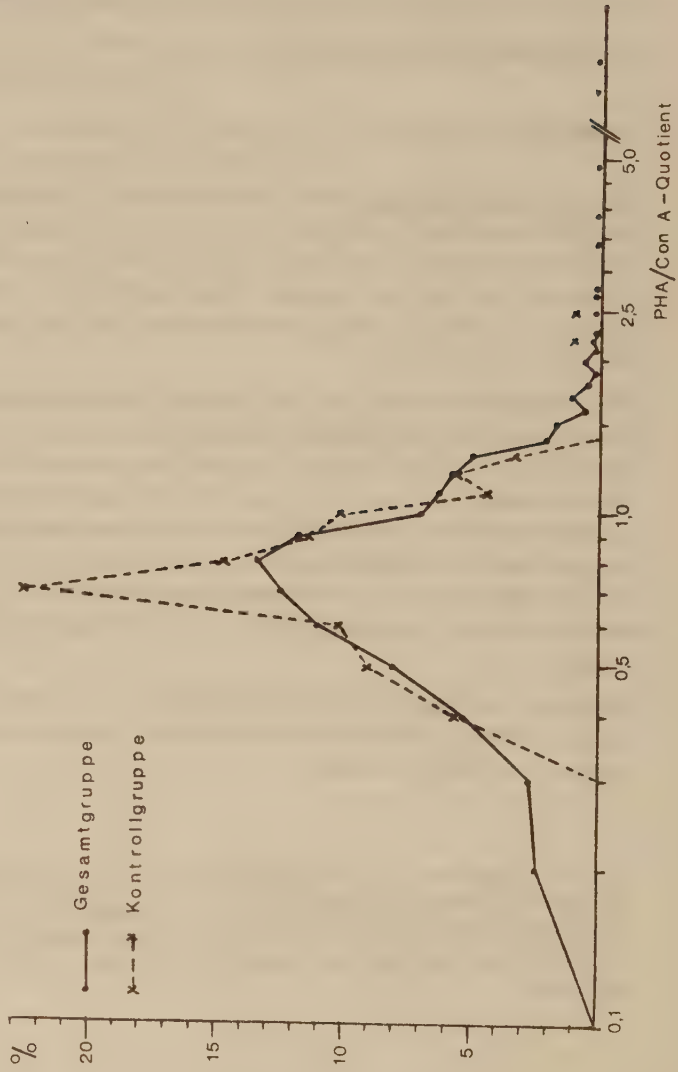
Bei der Kontrollgruppe (88 Untersuchungen^{*}) schwankte der PHA/Con A-Quotient zwischen 0,4 und 2,5 mit einem Verteilungsmaximum bei 0,7 (s. Abb. 5.1.1). 97,7 % der Untersuchungen (86 von 88) ergaben einen Quotienten zwischen 0,4 und 1,3; nur in zwei Untersuchungen lag der Quotient höher (2,2 und 2,5).

Die Häufigkeitsverteilung des PHA/Con A-Quotienten bei allen untersuchten Personen (655 Untersuchungen^{*}) war breiter als die der Kontrollgruppe: die Quotienten lagen hier zwischen 0,2 und 38,4. Das Verteilungsmaximum der Gesamtgruppe (0,8) unterschied sich nur unwesentlich von dem der Kontrollgruppe (0,7). Außerhalb der Quotienten 0,4 und 1,3 (s.o.) befanden sich insgesamt 13,7 % der Quotienten (im Vergleich zu 2,3 % bei der Kontrollgruppe).

Insgesamt lag also der PHA/Con A-Quotient bei der Gesamtgruppe sechsmal häufiger außerhalb des "Normbereiches" als bei der Kontrollgruppe.

^{*} Da bei insgesamt 24 Untersuchungen nur mit zwei der drei Mitogene stimuliert werden konnte, ist die Anzahl der Stimulationsquotienten PHA/Con A, PHA/PWM und Con A/PWM bei der Kontrollgruppe wie auch bei der Gesamtgruppe voneinander und von den in Kapitel 3.1 genannten Zahlen verschieden.

Abb. 5.1.1
Prozentuale Verteilung des PHA/Con A-Quotienten bei der Kontrollgruppe (88 Untersuchungen)
und bei allen untersuchten Personen (665 Untersuchungen).



Extrem niedrige Quotienten

Niedrige PHA/Con A-Quotienten (unter 0,4) wurden bei insgesamt 34 Probanden (5,2 %) gemessen. Auffallend war, daß sich darunter 7 Patienten mit primären (SCID = schwere kombinierte Immundefizienz; Bruton = kongenitale Agammaglobulinämie) und sekundären Immundefizienzen befanden (Morbus Hodgkin, Zustand nach zytotoxischer Therapie wegen ALL oder Wilms-Tumor, s. Tab. 5.1.1a).

Extrem hohe Quotienten

PHA/Con A-Quotienten über 1,3 traten in der Gesamtgruppe 56 mal auf (8,5 %). Unter Patienten dieser Gruppe fanden sich 10 Kinder mit ALL vor Beginn der zytotoxischen Therapie und 5 Kinder mit Zöliakie unter glutenfreier Diät (s. Tab. 5.1.1b).

Tab. 5.1.1a

Patienten mit primären und sekundären Immundefizienzen und extrem niedrigen
PHA/Con A-Quotienten ($< 0,4$)

PHA/Con A	SCID (vor GvH)	Bruton	M. Hodgkin vor Therapie	ALL während u. nach Therapie	Wilms-Tumor unter Therapie
0,2	1	1		2	1
0,3		1	1		
Häufigkeit extrem nie- driger Werte	1	2	1	2	1
Gesamtzahl d. Unters. an Pat. mit der betref. Diagnose	1	3	7	38	3

Tab. 5.1.1b

Patienten mit ALL vor zytotoxischer Therapie oder mit
Zöliakie und extrem hohen PHA/Con A-Quotienten ($> 1,3$)

PHA/Con A	ALL vor Therapie	Zöliakie
1,4	1	4
1,5	2	
1,6	2	
1,7	2	
3,4	1	
4,8		1
9,1	1	
38,4	1	
Häufigkeit extrem hoher Werte	10	5
Gesamtzahl d. Unters. an Pat. mit der betreff. Diagnose	28	38

5.1.2 PHA/PWM-Quotient

N o r m b e r e i c h

Der PHA/PWM-Quotient schwankte bei Gesunden (91 Untersuchungen) zwischen 0,6 und 3,7 mit einem Maximalbereich zwischen 1,2 und 2,0 (s. Abb. 5.1.2). 97,8 % der Untersuchungen ergaben Quotienten zwischen 0,8 und 3,3; nur 2 Kontrollpersonen lagen außerhalb des "Normbereichs" (0,6 und 3,7).

Die Häufigkeitsverteilung des PHA/PWM-Quotienten war bei allen untersuchten Personen (663 Untersuchungen) breiter als bei der Kontrollgruppe: der Quotient streute zwischen 0,1 und 270,5 mit einem Verteilungsmaximum bei 1,5. 12,5 % der Quotienten aller Untersuchten waren kleiner als 0,8 oder größer als 3,3.

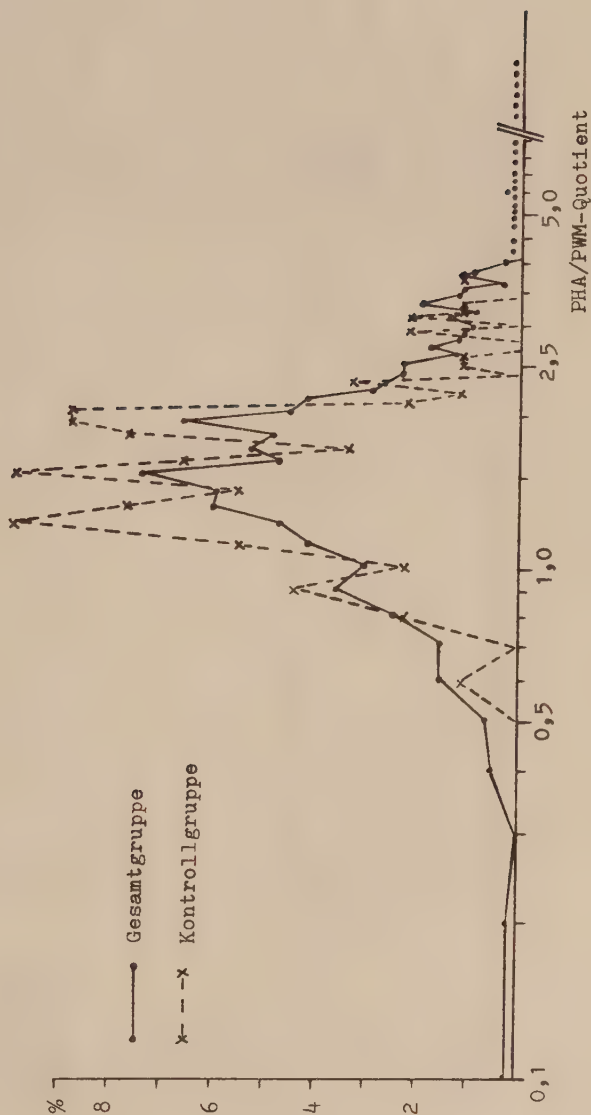
Im Vergleich zu 2,2 % bei der Kontrollgruppe lag der PHA/PWM-Quotient bei der Gesamtgruppe also etwa 6 mal häufiger außerhalb des "Normbereichs".

E x t r e m n i e d r i g e Q u o t i e n t e n

Bei 29 Probanden (4,4 %) wurden niedrige PHA/PWM-Quotienten (unter 0,8) gemessen. Ebenso wie niedrige PHA/Con A-Quotienten traten auch niedrige PHA/PWM-Quotienten besonders häufig (10 x) bei Patienten mit primären und sekundären Immundefizienzen auf (Tab. 5.1.2a).

Von den 29 Probanden, deren PHA/PWM-Quotient unter 0,8 lag, und den 34 Probanden mit PHA/ConA-Quotienten unter 0,4 waren 18 identisch, d.h. bei diesen Probanden war - bezogen auf die Reaktion auf PHA - sowohl die Reaktion auf PWM wie auch die Reaktion auf Con A relativ hoch.

Abb. 5.1.2
Prozentuale Verteilung des PHA/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe (91 Untersuchungen)
und bei allen untersuchten Personen (663 Untersuchungen).



Tab. 5.1.2a

Patienten mit primären und sekundären Immundefizienzen und PHA/PWM-Quotienten unter 0,8

PHA/PWM	SCID (vor GvH)	Immundef.	Bruton	ALL			Lymphome
				unter u. nach Therapie	vor Therapie	Wilms' Tumor	
0,4			1	1			
0,5		1		1			
0,6				1	1		
0,7	1	1				1	1
Häufigkeit extrem nie- riger Werte	1	2	1	3	1	1	1
Gesamtzahl d. Unters. an Pat. mit der betref. Diagnose	1	6	3	38	28	3	11

E x t r e m h o h e Q u o t i e n t e n

PHA/PWM-Quotienten über 3,3 wurden bei 54 Probanden (8,1 %) gemessen. Auffallend häufig waren in dieser Gruppe Kinder mit ALL vor Einleitung der zytotoxischen Therapie (n=11) und an Zöliakie erkrankte Kinder (n=7) vertreten (Tab. 5.1.2b). Diese beiden Patientengruppen waren auch schon durch ihre besonders hohen PHA/Con A-Quotienten auffallen (s. 5.1.1).

Tab. 5.1.2b

Patienten mit ALL vor zytotoxischer Therapie oder
mit Zöliakie und PHA/PWM-Quotienten über 3,3

PHA/PWM	ALL vor Therapie	Zöliakie
3,4	1	1
3,5	2	1
3,6	1	
3,8	1	1
4,7	1	
5,0		1
6,0	1	
6,6		1
6,9		1
7,6	1	
11,2	1	
11,9	1	
14,9	1	
270,5		1
Häufigkeit extrem hoher Werte	11	7
Gesamtzahl d. Unters. an Pat. mit der betreff. Diagnose	28	38

5.1.3 Con A/PWM-Quotient

N o r m b e r e i c h

Bei der Kontrollgruppe (87 Untersuchungen) schwankte der Con A/PWM-Quotient zwischen 0,7 und 5,9 mit einem Verteilungsmaximum bei 2,0 (s. Abb. 5.1.3). 97,7 % der Quotienten lagen zwischen 0,7 und 4,0; nur bei 2 Kontrollpersonen ergab die Untersuchung einen höheren Quotienten (4,8 und 5,9).

Wie schon der PHA/Con A-Quotient und der PHA/PWM-Quotient wies auch der Con A/PWM-Quotient bei der Gesamtgruppe der Untersuchten einen breiteren Streubereich auf: bei allen Untersuchungen (n=666) streute der Quotient zwischen 0,1 und 132; das Maximum der Verteilung lag - wie das der Kontrollpersonen - bei 2,0.

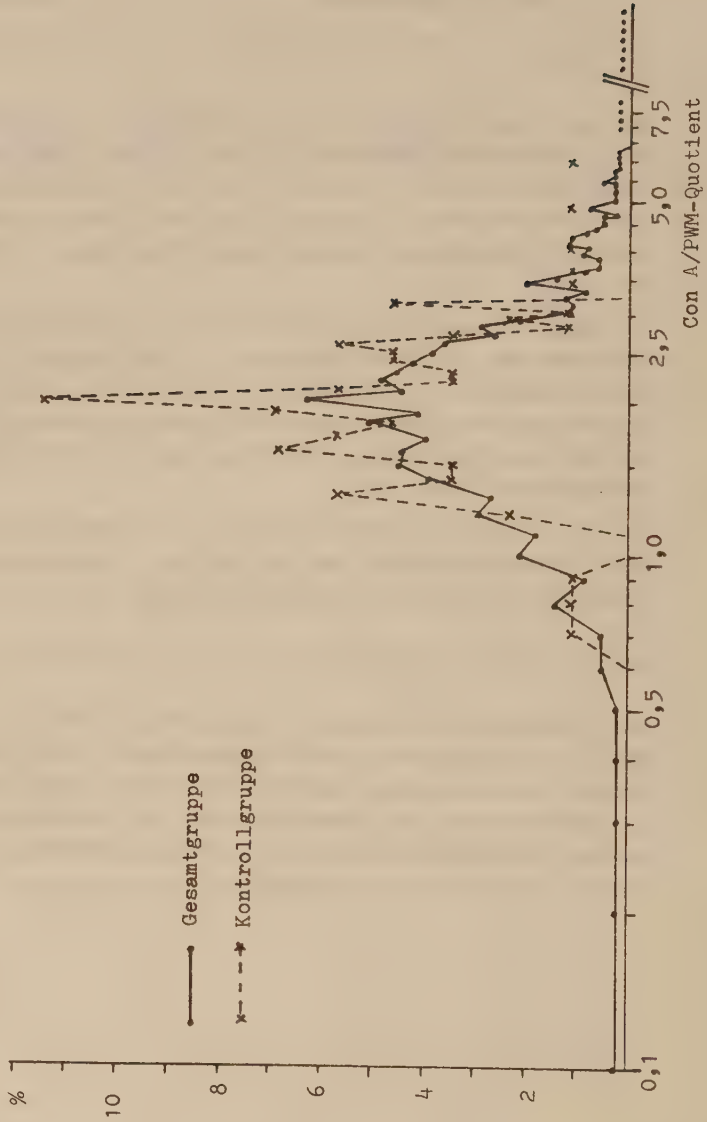
Bei 12,0 % aller Probanden lag der Con A/PWM-Quotient außerhalb des "Normbereichs" von 0,7 bis 4,0, insgesamt also etwa 5 mal häufiger als bei der Kontrollgruppe (2,3 %).

E x t r e m n i e d r i g e Q u o t i e n t e n

Con A/PWM-Quotienten unter 0,7 kamen insgesamt nur 8 mal vor (1,2 %), davon 3 mal bei Kindern mit ALL vor Einleitung der zytotoxischen Therapie. Die beiden niedrigsten Quotienten traten bei einem Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz auf, der nach einer Bluttransfusion an einer Graft-versus-host-Reaktion erkrankte (Tab. 5.1.3a).

Abb. 5.1.3

Prozentuale Verteilung des Con A/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe (87 Untersuchungen) und bei allen untersuchten Personen (666 Untersuchungen).



Tab. 5.1.3a

Con A/PWM-Quotienten unter 0,7 bei Patienten mit ALL vor zytotoxischer Therapie und einem Patienten mit SCID und GvH-Reaktion nach einer Bluttransfusion

Con A/PWM	ALL vor Therapie	SCID nach GvH
0,1		1
0,2		1
0,3	1	
0,5	1	
0,6	1	
Häufigkeit extrem nie- driger Werte	3	2
Gesamtzahl der Untersuchungen an Pat. mit der betreff. Diagnose	28	2

Extrem hohe Quotienten

Bei 72 Probanden (10,8 %) wurden Con A/PWM-Quotienten über 4,0 gemessen. Auffallend häufig waren in dieser Gruppe - wie bei den Quotienten PHA/Con A und PHA/PWM - Kinder mit Zöliakie (n=10) und mit ALL vor zytotoxischer Therapie (n=7). Außerdem enthielt diese Gruppe 4 Patienten mit schon behandelter ALL, 4 an Morbus Hodgkin erkrankte Kinder und einen Patienten mit der Diagnose "Autoimmun-hämolytische Anämie, Nephritis" bei dem in 7 Untersuchungen 4 mal extrem hohe Con A/PWM-Quotienten gemessen wurden (Tab. 5.1.3b).

Tab. 5.1.3b

Con A/PWM-Quotienten über 4,0 bei Patienten mit Zöliakie, ALL vor, unter und nach zytotoxischer Therapie, M. Hodgkin und einem Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie:

Con A/PWM	Zöliakie	ALL vor Therapie	ALL unter und nach Therapie	M. Hodgkin vor u. unter Therapie	Autoimmunh. Anämie
4,1		1			
4,2		1			
4,3	3	1	1		
4,4		1			
4,6	1				
4,7	1		1		
4,8					
5,0		1		1	
5,2					
5,3		1		1	
5,4		1			
5,7		1		1	
5,8	1				
6,0	1				1
6,2					
6,3				1	
7,1	1		1		
7,5			1		1
7,6					
9,1		1			1
10,3					1
56,1	1				
Häufigkeit extrem hoher Werte	10	7	4	4	4
Gesamtzahl d. Untersuch. an Pat mit der betref. Diagnose	38	28	38	7	7

Tab. 5.2

Anzahl der verminderten ($\downarrow$), normalen (n) und erhöhten ($\uparrow$) Stimulationsquotienten bei Gesunden und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen.

Diagnose	Anzahl der Personen	Anzahl der Untersuch.	PHA/ConA		PHA/PWM		ConA/PWM	
			$\downarrow$	n	$\downarrow$	n	$\downarrow$	n
Kontrollpersonen	51	91	-	89	1	89	-	89
Kontrolle von auswärts	33	43	3	28	11	36	1	39
Angehörige der Patienten	184	198	8	175	9	183	-	184
erhöhte Infektanfälligkeit, Verdacht auf Immundefekt	53	60	6	47	3	52	-	52
Immundefizienz	6	6	-	6	-	3	-	3
schwere kombinierte Immundefizienz	1	3	1	-	1	1	-	1
Bruton	2	3	2	1	-	2	-	2
Hypogammaglobulinämie	5	6	-	6	-	6	-	6
Ig A-Mangel	4	5	-	4	1	4	-	5
Wiskott-Aldrich-Syndrom	3	3	-	2	1	2	-	3
Louis-Bar-Syndrom	3	3	-	3	-	3	-	3
DiGeorge-Syndrom	1	2	-	2	-	2	-	2
akute lymphatische Leukämie	42	66	2	53	11	48	3	52
akute myeloische Leukämie	6	6	-	3	2	5	1	5
Morbus Hodgkin	6	7	1	6	-	6	-	3
andere Lymphome	8	11	-	9	1	9	-	11

Tab. 5.2 Fortsetzung

Diagnose	Anzahl der Personen	Anzahl der Untersuch.	PHA/ConA		PHA/PWM		ConA/FWM	
			↓	↑	↓	↑	↓	↑
Wilms-Tumor	3	3	1	2	1	2	-	2
andere Tumoren	2	2	-	2	-	1	-	2
Dermatomyositis	5	5	1	4	1	4	-	4
Sklerodermie	2	2	-	2	-	1	-	2
Morbus Crohn	8	9	-	8	-	9	-	7
Autoimmunhämolytische Anämie, Nephritis	1	7	-	6	1	4	-	3
Aplastische Anämie	5	8	-	7	-	6	-	7
Perniziöse Anämie	1	1	-	1	-	1	-	1
Blackfan-Diamond Anämie	1	2	-	2	-	2	-	2
Eosinophilie	1	1	1	-	1	-	-	1
Löffler Syndrom	1	4	-	3	1	1	-	2
Thrombopenie	1	4	-	3	-	4	-	3
juvenile chronische Arthritis	32	32	4	22	2	22	-	21
Morbus Still	1	2	-	2	-	2	-	2
chron. Hepatitis B	6	6	-	6	-	5	-	6
Zöliakie	38	38	-	32	5	30	-	28
cystische Fibrose	1	2	-	2	-	1	-	1
Bronchiektasen	2	2	1	1	-	2	-	1
Asthma	3	3	-	2	1	3	-	3
chron. asthm. Bronchitis, Ig A-Mangel, Eosinophilie	1	5	2	3	-	3	1	3

Tab. 5.2 Fortsetzung

Diagnose	Anzahl der Personen	Anzahl der Untersuch.	PHA/ConA ↓ n ↑	PHA/PWM ↓ n ↑	ConA /PWM ↓ n ↑
Atelektasen, Mittellappen- syndrom	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Hiatushernie, Nebenlunge	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
subakute sklerosierende Panencephalitis	2	3	- 3 -	- 3 -	- 2 1
Nephrotisches Syndrom	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Morbus Farber	1	3	- 2 1	- 3 -	- 3 -
Kala-Azar	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Morbus Wissler, Tuberkulose	1	1	1 - -	1 - -	- 1 -
Hypothyreose	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Morbus Addison	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Russel-Silver-Syndrom	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Ekzem	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Morbus Down, chronische Pyelonephritis	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Lymphadenopathie	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Diabetes insipidus	1	1	- 1 -	- 1 -	- 1 -
Ichthyosis, Minderwuchs	2	2	- 1 1	- 2 -	- 2 -
Diagnose unbekannt	7	7	- 6 1	- 7 -	- 7 -
Summe	547	678	34 565 56	29 580 54	8 586 72

5.2 Stimationsquotienten bei bestimmten Personengruppen

Tabelle 5.2 gibt eine Übersicht über die Erkrankungen der untersuchten Probanden und über das Verhalten ihrer Stimationsquotienten. Im folgenden Kapitel werden drei Personen-
gruppen näher beschrieben.

5.2.1 Stimationsquotienten bei Gesunden

Nahezu die Hälfte aller Untersuchten (49 %) waren Gesunde, von denen jedoch nur 51 als Kontrollpersonen gewertet wurden. 33 gesunde Probanden wurden als eigene Gruppe behandelt, da ihre Blutprobe von außerhalb zugeschickt worden war und die Zellen deshalb nicht sofort untersucht werden konnten. Ebenso wurden 184 Angehörige von Patienten nicht zu den Kontrollpersonen gerechnet, um mögliche, genetisch vorhandene, klinisch aber nicht evidente Immundefizienzen auszuschließen. Tabelle 5.2 zeigt, wie oft die Stimationsquotienten dieser Probanden außerhalb der jeweiligen Normbereiche liegen. Die folgende Tabelle gibt denselben Sachverhalt in Prozenten wieder:

	Anzahl d. Personen	Anzahl d. Unters.	PHA/Con A			PHA/PWM			Con A/PWM		
			↓	n	↑	↓	n	↑	↓	n	↑
			in %			in %			in %		
Kontroll- personen	51	91	-	98	2	1	98	1	-	98	2
Kontrolle von auswärts	33	43	7	67	26	5	88	7	2	91	7
Angehörige	184	198	4	91	5	2	93	6	-	94	6
Patienten	279	346	7	83	10	7	81	12	2	81	17

Am häufigsten liegen jeweils die Quotienten der Kontrollpersonen innerhalb des Normbereichs. Bei den Quotienten PHA/PWM und Con A/PWM folgen die Angehörigen, dann die gesunden Probanden von außerhalb und schließlich die Patienten. Bei PHA/Con A trifft diese Reihenfolge nicht zu, da dieser Quotient bei nur 67 % der Untersuchungen an "gesunden Personen von außerhalb" im Normbereich liegt. Obwohl dafür zu einem großen Teil ein sechsmal untersuchter Proband verantwortlich ist, dessen PHA/Con A-Quotient fünfmal erhöht ist, liegen doch auch ohne dessen Berücksichtigung nur 75 % der PHA/Con A-Quotienten dieser Gruppe im Normbereich. Die Tatsache, daß die Blutprobe dieser Probanden verschickt wurde und nicht sofort untersucht werden konnte, hatte also einen nicht zu übersehenden Einfluß auf die Stimulationsquotienten; die Quotienten der Angehörigen unterscheiden sich weit weniger von denen der eigentlichen Kontrollpersonen.

5.2.2 Stimationsquotienten bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL)

Unter den Probanden befanden sich 42 an ALL erkrankte Kinder, an denen 66 Untersuchungen vorgenommen wurden. Da diese Kinder zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf ihrer Krankheit untersucht wurden, können sie nicht als einheitliches Kollektiv betrachtet werden. Es lassen sich jedoch drei größere Gruppen bilden:

- 1) 28 Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung d.h. vor Einleitung der zytostatischen Therapie untersucht wurden,
- 2) 10 Patienten, die nach der ersten Phase der Therapie, der vier- bis fünföchigen Induktionsphase untersucht wurden und sich in Vollremission befanden. Dabei handelt es sich in sieben Fällen um Patienten, die auch der Gruppe 1) angehören.
- 3) 8 Untersuchungen an 6 Patienten, die 21 bis 43 Monate nach Abschluß der zweieinhalbjährigen zytostatischen Therapie untersucht wurden und kein Rezidiv erlitten hatten.

Von den verbleibenden 20 Untersuchungen wurden 11 an einem Mädchen nach einer Knochenmarkstransplantation vorgenommen, das in Kapitel 5.3 gesondert beschrieben wird. Die Stimationsquotienten der restlichen neun Untersuchungen wurden vorwiegend nach der zur Therapie gehörenden prophylaktischen Schädelhirnbestrahlung gewonnen und lagen im übrigen stets im Normbereich.

Vergleicht man die Stimulationsquotienten der Gruppen 1), 2) und 3), so zeigen sich einige Auffälligkeiten:

Der PHA/Con A -Quotient (s. Abb. 5.2.2.1) ist vor Beginn der Therapie verhältnismäßig hoch; 10 der 28 Quotienten liegen oberhalb, die übrigen im Normbereich. Nach der Induktionsphase und nach Abschluß der Therapie befindet sich jeweils ein Quotient unterhalb, alle anderen im Normbereich.

Auch der PHA/PWM-Quotient (s. Abb. 5.2.2.2) ist vor der Therapie im Durchschnitt deutlich höher als nach der Induktionsphase. Während vor der Therapie 11 von 28 Quotienten oberhalb des Normbereichs liegen, befinden sich nach der Induktionstherapie alle Quotienten in den unteren 2/3 des Normbereichs oder darunter. Nach Abschluß der Therapie kommen hier allerdings in 3 von 8 Untersuchungen Quotienten oberhalb des Normbereichs vor.

Der Con A/PWM-Quotient (s. Abb. 5.2.2.3) liegt bei den 28 vor Einleitung der Therapie untersuchten Kinder dreimal unterhalb und siebenmal oberhalb des Normbereichs, nach der Induktionsphase befinden sich alle Quotienten im Normbereich. Auffallend ist, daß nach der Induktionsphase mit einer Ausnahme alle Quotienten $\leq 2,3$, nach Abschluß der Therapie jedoch alle Quotienten $\geq 2,3$ sind.

Insgesamt läßt sich also nach Einleitung der Therapie eine Normalisierung der Stimulationsquotienten beobachten, die vor der Therapie zu einem großen Teil Extremwerte angenommen hatten. Nach Abschluß der Therapie kommen Extremwerte wieder häufiger vor.

Auch die Reaktion der Lymphozyten nach Stimulation mit den drei Mitogenen ist bei den nach der Induktionsphase untersuchten Kindern stärker als bei den beiden anderen Gruppen. Die 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA ist vor Beginn der Therapie auffallend niedrig, sie beträgt im Mittel 13242 cpm. Im Vergleich dazu ist die durchschnittliche Antwort auf PHA nach der Induktionsphase um 77 % höher (23419 cpm). Nach der Therapie ist die durch PHA induzierte Reaktion mit durchschnittlich 17416 cpm um 32 % höher als vor der Therapie.

Die Verminderung der Stimulationsquotienten PHA/Con A, PHA/PWM und Con A/PWM nach der Induktionsphase gegenüber den vor Einleitung der Therapie gefundenen Quotienten ist also auf eine unterschiedlich starke Zunahme der Reaktion auf alle drei Mitogene zurückzuführen. Dabei ist nach Stimulation mit PWM die stärkste, nach Stimulation mit PHA die schwächste relative Zunahme zu verzeichnen.

Auch nach Abschluß der Therapie ist gegenüber den vor Beginn der Therapie untersuchten Patienten die Antwort auf Con A relativ stärker als auf PHA erhöht. Durch PWM lassen sich die Lymphozyten einiger dieser Kinder jedoch verhältnismäßig schlecht stimulieren (die durchschnittliche 3H-Thymidinaufnahme beträgt 9016 cpm).

Einschränkend muß bei all diesen Beobachtungen daran erinnert werden, daß es sich bei den drei beschriebenen Patientengruppen nur in wenigen Fällen um dieselben Kinder handelt.

Abb. 5.2.2.1

PHA/ConA bei Kindern mit ALL

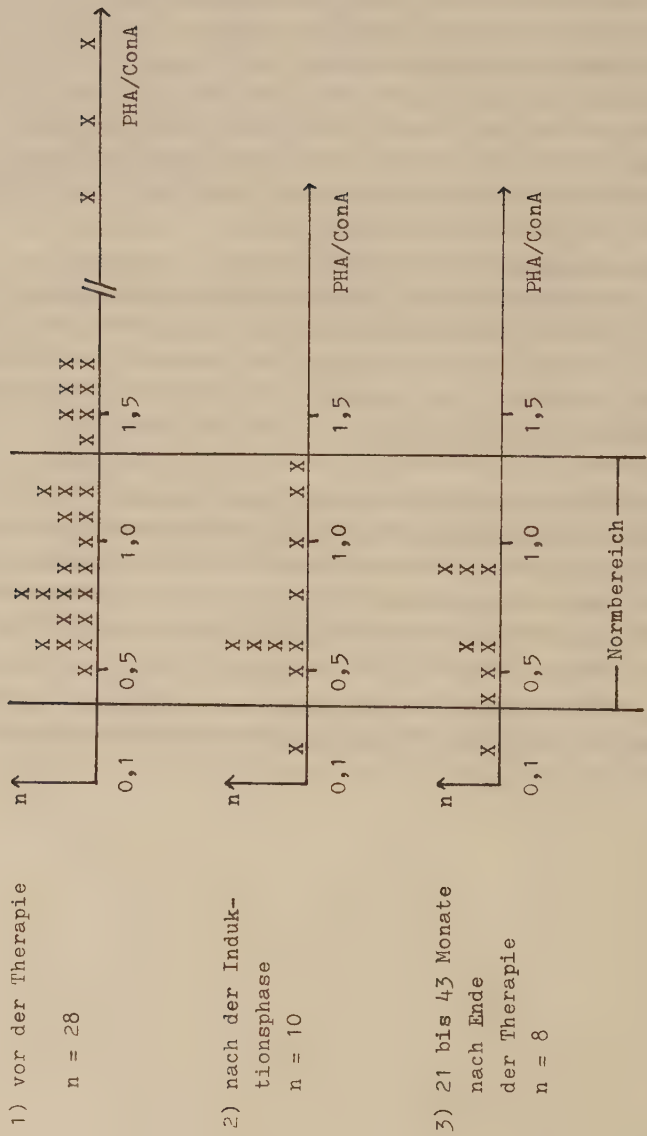


Abb. 5.2.2.2

PHA/PWM bei Kindern mit ALL

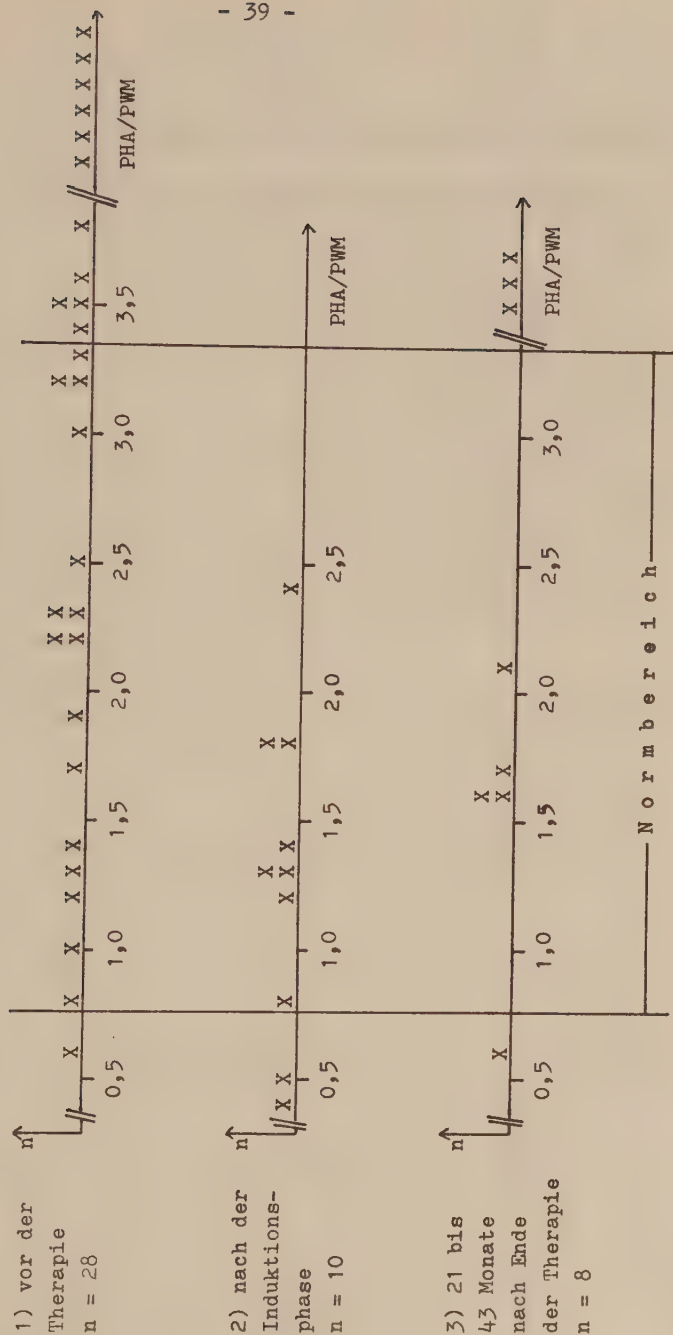
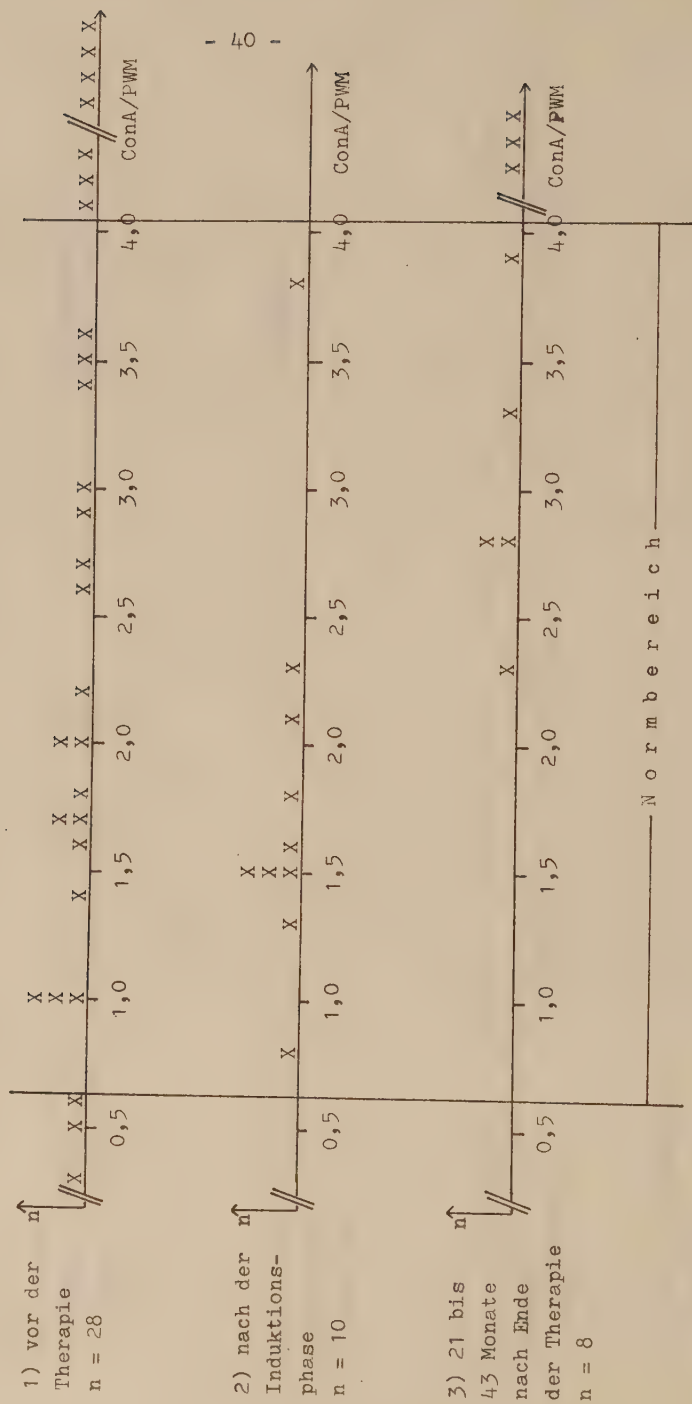


Abb. 5.2.2.3

ConA/PWM bei Kindern mit ALL



5.2.3 Stimulationsquotienten bei Patienten mit Zöliakie

Unter den Probanden befanden sich 38 an Zöliakie erkrankte Kinder, von denen jedes einmal untersucht wurde. Vergleicht man die Verteilung der drei Stimulationsquotienten dieser Kinder mit der der Kontrollpersonen, so fällt eine Verschiebung nach rechts, d.h. zu höheren Quotienten auf (Abb. 5.2.3a, 5.2.3.b, 5.2.3 c). Diese Verschiebung in den höheren Bereich wird deutlich, wenn man a) die Werte der Patienten in bezug auf den Normbereich und b) im Vergleich zum Median-Wert beurteilt. Bei keinem der 38 Patienten liegt einer der drei Quotienten unterhalb des Normbereichs, dagegen befindet sich PHA/Con A fünfmal, PHA/PWM siebenmal und Con A/PWM zehnmal oberhalb des Normbereichs. Das bedeutet, daß bei Zöliakie - bezogen auf die PHA-Reaktion - die Con A-, besonders aber die PWM-Reaktion (relativ) schwächer als bei gesunden Personen ist.

Der Median der PHA/Con A-Quotienten in der Kontrollgruppe ist 0,8; auf oder über diesem Wert liegen 76 % der Patienten mit Zöliakie. Der PHA/PWM-Quotient ist bei 78 %, der Con A/PWM-Quotient bei 76 % der Zöliakie-Patienten größer oder gleich dem Median der Kontrollgruppe (Median des PHA/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe = 1,6, Median des Con A/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe = 2,0).

Für alle drei Quotienten ist also in der Gruppe der Patienten mit Zöliakie eine Zunahme von 26-28 % über den erwarteten Wert zu beobachten.

Die 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA ist bei den an Zöliakie erkrankten Kindern gegenüber Gesunden nicht vermindert; sie beträgt im Mittel 43220 cpm. Aufgrund der Rechtsverschiebung der drei Stimulationsquotienten kann man deshalb sagen, daß im Vergleich zur PHA-Reaktion die Reaktion auf Con A relativ schwach, die Reaktion auf PWM relativ stark herabgesetzt ist.

Abb. 5.2.3a
Prozentuale Verteilung des PHA/Con A-Quotienten bei der Kontrollgruppe (88 Untersuchungen)
und bei Patienten mit Zöliakie (38 Untersuchungen).

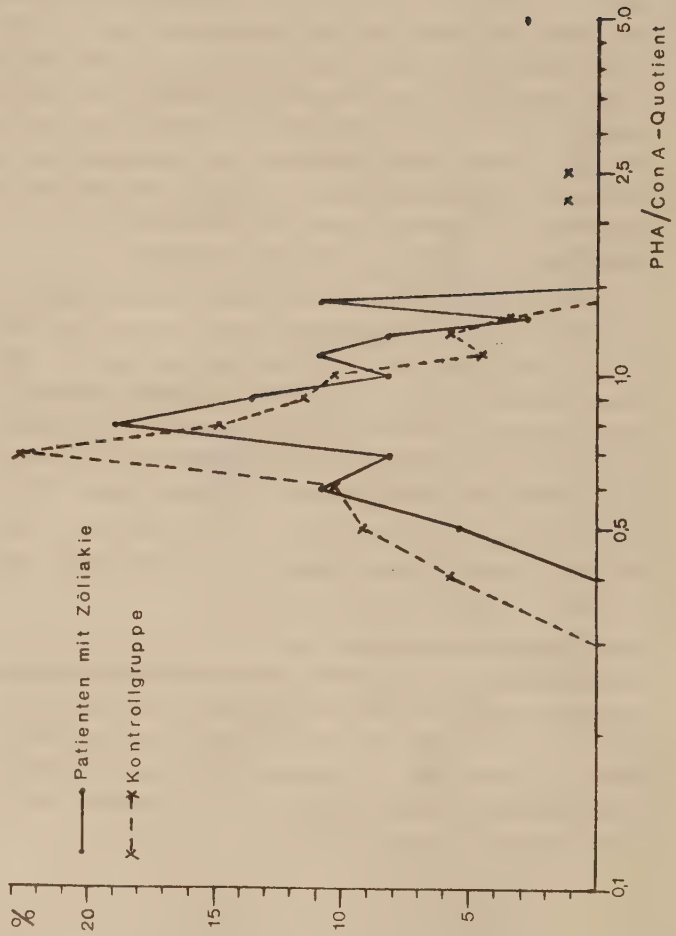


Abb. 5.2.3b
Prozentuale Verteilung des PHA/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe (91 Untersuchungen)
und bei Patienten mit Zöliakie (38 Untersuchungen).

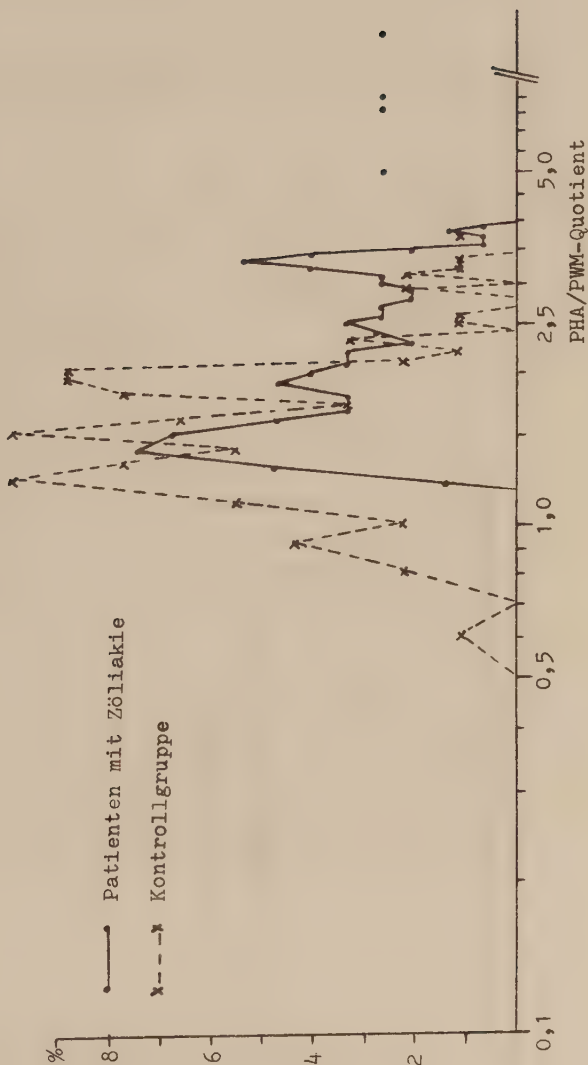
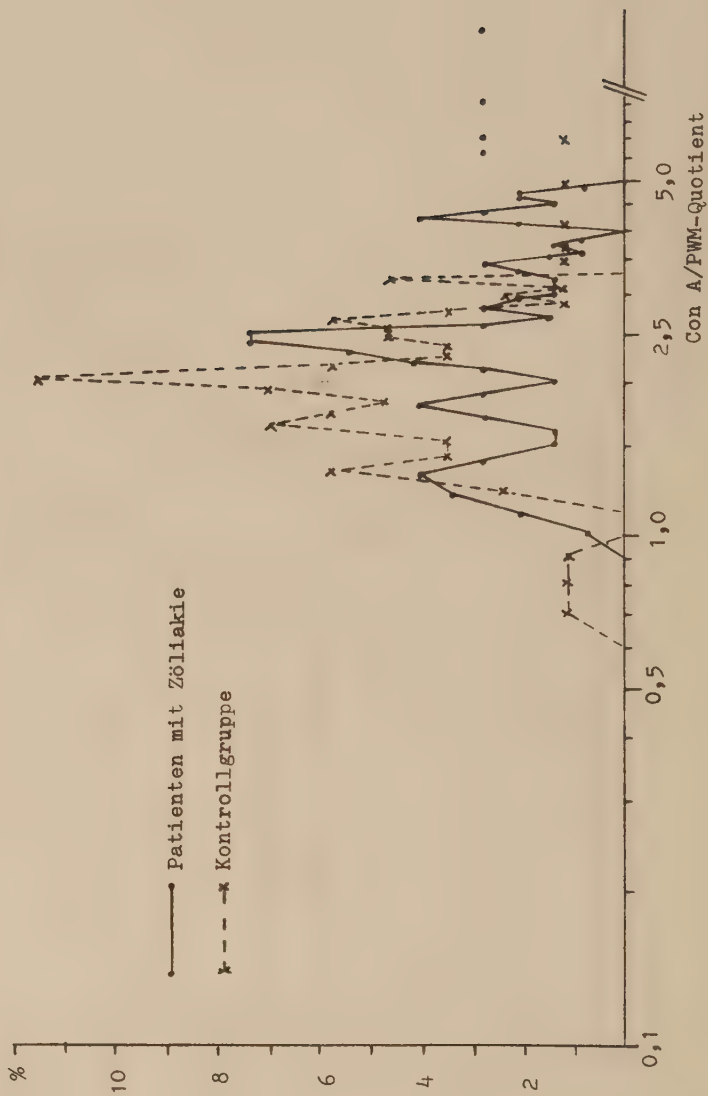


Abb. 5.2.3c
 Prozentuale Verteilung des Con A/PWM-Quotienten bei der Kontrollgruppe (87 Untersuchungen)
 und bei Patienten mit Zöliakie (38 Untersuchungen).



5.3 Stimulationsquotienten bei einzelnen Probanden

In diesem Kapitel werden die Untersuchungsergebnisse von Probanden beschrieben, die entweder als Kontrollperson oder als Patienten mit besonderem Krankheitsverlauf mehrfach untersucht wurden.

1) Eine Kontrollperson wurde 14 mal untersucht (s. Tab. 5.3.1). Bei dieser Probandin stieg die ³H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA und PWM in der Zeit von Juli 1977 bis Mai/Juni 1978 auf mehr als das Dreifache des Ausgangswertes an; die Reaktion auf Con A nahm in derselben Zeit weniger deutlich zu. Im Juli 1978 war die Antwort auf alle drei Mitogene wieder etwas niedriger.

Trotz der großen Streubreite der Reaktion auf PHA, Con A und PWM veränderten sich die Stimulationsquotienten PHA/Con A, PHA/PWM und Con A/PWM nur wenig. Alle drei Quotienten liegen - von zwei Untersuchungen abgesehen - stets in einem schmalen Band des Normbereichs. Dabei fällt eine nahezu stetige Abnahme des Quotienten Con A/PWM während des gesamten Untersuchungszeitraumes auf, bedingt durch das deutliche Anwachsen der Reaktion auf PWM. Am 5. August 1977 war die Antwort auf PWM im Verhältnis zu der auf die beiden anderen Mitogene besonders niedrig, dadurch lag der Quotient Con A/PWM knapp über, der Quotient PHA/PWM knapp unter der oberen Grenze des Normbereichs. Am 30. Juni 1978 reagierten die Lymphozyten schwach auf PHA, so daß der Quotient PHA/Con A an der unteren Grenze des Normbereichs und der Quotient PHA/PWM unterhalb dieser Grenze lag.

Tab. 5.3.1

³H-Thymidinaufnahme und Stimulationsquotienten bei einer mehrfach untersuchten Kontrollperson

Datum der Untersuchung	3H-Thymidinaufnahme (cpm) nach Stimulation mit		Kontrollwert (cpm)	PHA/Con A		PHA/PWM	Con A/PWM
	PHA	Con A	PWM				
20.7.77	15.422	-	7.316	-		2,1	-
5.8.77	23.129	35.410	7.360	0,7		3,1	4,8
12.8.77	28.960	26.105	9.867	1,1		2,9	2,6
9.9.77	28.473	29.805	14.685	1,0		1,9	2,0
14.10.77	26.316	35.714	17.641	0,7		1,5	2,0
25.11.77	23.071	34.374	15.126	0,7		1,5	2,3
28.3.78	39.594	51.774	26.078	0,8		1,5	2,0
23.5.78	50.899	48.427	22.968	1,1		2,2	2,1
2.6.78	40.595	59.404	24.793	0,7		1,6	2,4
9.6.78	43.057	50.068	26.600	0,9		1,6	1,9
30.6.78	18.588	43.678	29.943	0,4		0,6	1,5
4.7.78	41.302	33.440	24.707	1,2		1,7	1,4
7.7.78	34.906	46.791	29.910	0,7		1,2	1,6
18.7.78	29.645	30.941	22.795	1,0		1,3	1,4

2) Eine weitere häufig untersuchte Probandin war ein 11-jähriges Mädchen im dritten Rezidiv einer akuten unreif-zelligen Leukämie, an der eine Ganzkörperbestrahlung (9.2.78) mit Knochenmarkstransplantation (10.2.78) vorgenommen wurde. Die Patientin erholte sich nach dieser Behandlung gut und erlitt in den seither vergangenen drei Jahren kein weiteres Rezidiv.

Bei diesem Mädchen nahm die Reaktion auf Con A nach der Transplantation zunächst deutlich ab (s. Tab. 5.3.2); die Reaktion auf PHA und PWM nahm weniger stark ab. Am 27.2.78 ließ sich durch PWM sogar eine erstaunlich gute Reaktion erzielen. Die Reaktion auf alle drei Mitogene erholte sich während des ersten Monats nach dem Eingriff wieder und nahm dann innerhalb von zwei Wochen um etwa 60 % ab. In diese zwei Wochen fielen die Rekontamination und die Entlassung der Patientin. Im Laufe der nächsten vier Monate blieb die 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit Con A nahezu konstant, nach Stimulation mit PHA oder PWM jedoch sank sie kontinuierlich weiter ab.

Auf die Stimulationsquotienten wirkte sich dies folgendermaßen aus: Während am 27.1.78, also vor der Konditionierung zur Transplantation alle drei Quotienten im mittleren Normbereich lagen, befand sich der Quotient PHA/Con A nach der Transplantation am oberen Rand der Norm und sank nach drei Monaten bis an deren unteren Rand ab. Der Quotient PHA/PWM lag - abgesehen von einem niedrigen Wert am 27.2.78 - stets im mittleren Normbereich. Der Quotient Con A/PWM lag am 27.2.78 am unteren Rand der Norm, in den folgenden zwei Monaten nur wenig darüber und stieg dann bis an den oberen Rand der Norm an.

Im letzten Monat des in dieser Studie berücksichtigten Zeitraums (Juli 78) wurde die niedrigste 3H-Thymidinaufnahme dieser Patientin gemessen. Danach erholte sich die Reaktion auf PHA und Con A schneller als auf PWM, so daß die beiden Untersuchungen im Jahr 1979 PHA/PWM- und Con A/PWM-Quotienten über dem Normbereich ergaben. Bei der einzigen Untersuchung im Jahr 1980 ließen sich die Lymphozyten der Probandin durch alle drei Mitogene besser als vor der Transplantation stimulieren und alle drei Stimulationsquotienten lagen im mittleren Normbereich.

3) Interessante Werte ergaben sich auch bei einem sechs-Monate alten Säugling mit schwerer kombinierter Immundefizienz, der eine Bluttransfusion erhalten hatte. Fünf Tage nach der Transfusion reagierten die Lymphozyten des Patienten schwach auf Con A (s. Tab. 5.3.3); nach Stimulation mit PHA oder PWM war keine Antwort meßbar. Nach dieser ersten Untersuchung erkrankte der Junge an einer Graft-versus-host-Reaktion (GvH). Daraufhin blieb die Reaktion auf Con A bei einer zweiten Untersuchung 12 Tage nach der Transfusion zunächst nahezu unverändert; durch PHA und PWM ließ sich nun jedoch eine etwa viermal höhere Antwort als durch Con A erzielen. Nach vier weiteren Tagen war bei fast unveränderter Reaktion auf PHA und PWM keine Stimulation durch Con A mehr möglich. Kurz darauf verstarb der Patient.

Infolge der beschriebenen Veränderungen der Reaktion auf die drei Mitogene war der PHA/Con A-Quotient vor der GvH extrem niedrig, danach extrem hoch; der Con A/PWM-Quotient lag vor der GvH im oberen Normbereich und war danach extrem niedrig, während der PHA/PWM-Quotient keine Extremwerte annahm.

Tab. 5.3.2 ^3H -Thymidinaufnahme und Stimulationsquotienten bei einer Patientin mit akuter unreifzelliger Leukämie

Datum	^3H -Thymidinaufnahme (cpm) nach Stimulation mit		Kontroll- wert (cpm)	PHA/Con A	PHA/PWM	Con A/PWM
	PHA	Con A	PWM			
27.1.78	24.434	26.076	18.308	3.738	0,9	1,3
9.2.78	Ganzkörperbestrahlung					
10.2.78	Knochenmarktransplantation					
27.2.78	17.757	13.563	20.487	759	1,3	0,9
3.3.78	17.824	17.741	10.217	358	1,0	1,7
6.3.78	22.552	17.226	15.406	527	1,3	1,5
13.3.78	24.627	18.474	14.471	414	1,3	1,7
17.3.78	12.727	14.797	13.453	227	0,9	0,9
20.3.78	Rekontamination					
24.3.78	Entlassung aus der Klinik					
28.3.78	8.420	6.293	6.417	133	1,3	1,3
11.4.78	7.127	5.260	6.591	224	1,4	1,0
23.5.78	6.368	9.519	3.792	309	0,7	1,0
23.6.78	4.466	8.773	2.426	199	0,5	1,7
28.7.78	3.395	6.825	1.636	204	0,5	1,8
19.9.78	10.693	18.007	10.473	345	0,6	2,1
8.1.79	18.290	20.520	4.012	800	0,9	1,0
24.8.79	50.396	55.038	9.252	563	0,9	4,6
27.6.80	31.707	36.792	21.421	262	0,9	5,4
						1,5
						1,7

Tab. 5.3.3 ^3H -Thymidinaufnahme und Stimulationsquotienten bei einem Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz

Datum	^3H -Thymidinaufnahme (cpm) nach Stimulation mit		Kontrollblut (cpm)	PHA/Con A	PHA/PWM	Con A/PWM
	PHA	Con A				
20.7.77	Bluttransfusion					
25.7.77	235	1.242	361	215	0,2	0,7
	Beginn der Graft-verus-host-Reaktion					
1.8.77	5.541	1.408	5.970	581	3,9	0,2
5.8.77	6.809	538	4.141	612	12,7	1,6
						0,1

4) Eine stark gestörte Lymphozytenfunktion zeigte sich auch bei einem weiteren Probanden, der seit seinem 11. Lebensjahr (1970) an einer autoimmunhämolytischen Anämie litt, ein Jahr später splenektomiert wurde und 1974 an einer (ebenfalls durch autoimmunologische Prozesse zu erklärenden) interstitiellen Nephritis erkrankte. Während seines langjährigen Krankheitsverlaufs machte dieser Patient zahlreiche, häufig schwere Infektionen durch, bis er im 20. Lebensjahr an einer Pneumokokkensepsis starb.

In der Zeit vom August 77 bis Juli 78, in der 7 Lymphozytenstimulationstests durchgeführt wurden, ergaben sich folgende Komplikationen: Juni bis September 77 lymphozytäre Meningoenzephalitis, Ende Januar 78 Auftreten von Hirndruckzeichen bei multiplen ZNS-Prozessen, 3.2.78 Ventilimplantation, März 78 massive Zunahme der seit langem bestehenden Lungeninfiltrationen, in den folgenden Monaten Besserung des Lungen- und ZNS-Befundes und im Juni 78 eine Handphlegmone. Der Patient wurde mit einer Reihe von Medikamenten behandelt, darunter - auch im hier näher beschriebenen Zeitraum - mehrmals über einige Zeit mit Prednison oder Purinethol.

Die 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA, Con A und PWM war bei allen 7 Untersuchungen stark vermindert (s. Tab. 5.3.4); durch PHA konnte einmal, durch PWM mehrmals gar keine Reaktion erzielt werden. Dabei veränderte sich die Stärke der Reaktion auf die drei Mitogene entsprechend dem klinischen Befinden des jungen Mannes: Die schwächste Reaktion wurde am Tag der Ventilimplantation gemessen, die stärkste im Juli 78, als sich der Patient in gutem Allgemeinzustand befand.

Eine Abhängigkeit der Größe der einzelnen Stimulationsquotienten von Krankheitsverlauf oder Therapie läßt sich hier nicht erkennen. Es fällt jedoch auf, daß der Quotient PHA/Con A 6 mal den unteren Grenzwert des Normbereichs (0,4) annimmt und der Quotient Con A/PWM viermal weit oberhalb des Normbereichs liegt. Die Lymphozyten dieses Patienten ließen sich also, bei insgesamt sehr schwacher Reaktion, durch Con A am besten, durch PWM am wenigsten stimulieren.

Tab. 5.3.4 3H-Thymidinaufnahme und Stimulationsquotienten bei einem Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie

Datum der Untersuchung	3H-Thymidinaufnahme (cpm) nach Stimulation mit		Kontrollwert (cpm)	PHA/Con A		PHA/PWM	Con A/PWM
	PHA	Con A					
8.8.77	956	2.632	451				
30.8.77	2.924	1.700	1.311	0,4	2,1		5,8
3.2.78	430	1.133	676	1,7	2,2		1,3
19.6.78	1.495	4.016	439	0,4	0,6		1,7
30.6.78	1.622	4.391	428	0,4	3,4		9,1
7.7.78	5.380	12.016	1.694	0,4	3,8		10,3
21.7.78	3.003	7.245	2.743	0,4	3,2		7,1
				0,4	1,1		2,6

6. Diskussion

Die durch Lektine induzierte Transformation und Proliferation von Lymphozyten in vitro gehört zu den inzwischen fest in der klinischen Immundiagnostik etablierten Untersuchungsverfahren. Neuere Methoden zur Ermittlung der absoluten und relativen Zahl der Lymphozyten-Untergruppen geben über das Ausmaß einer Immundefizienz gerade bei partiellen Immunstörungen nicht immer verlässliche Werte , so daß auf funktionelle Untersuchungen wie die Stimulation von Lymphozyten mit Lektinen in der Immundiagnostik nicht verzichtet werden kann.

Für eine detaillierte Untersuchung werden nicht nur Dosis-Wirkungsuntersuchungen für jedes der Lektine gefordert, sondern auch eine Stimulation mit verschiedenen, möglichst einem breiten Spektrum von Lektinen (46-50). Dieses Postulat stößt in der praktischen Durchführung auf große Schwierigkeiten: gerade die Patienten mit ausgeprägten oder partiellen Immunstörungen sind häufig lymphopenisch, so daß sich - gerade wenn es sich um Kinder, insbesondere Säuglinge oder Neugeborene handelt - die notwendige Zahl von Lymphozyten gar nicht gewinnen läßt. Dieser Gegensatz zwischen Erwünschtem und Möglichem in der funktionellen Lymphozytenuntersuchung war der Anlaß zu dieser Analyse, in der wir uns die Frage stellten, ob es tatsächlich notwendig ist, in jeder Untersuchung eines Patienten mit den 3 wichtigsten Lektinen (PHA, Con A und PWM) zu stimulieren oder ob die Stimulation mit einem der Lektine allein ausreicht. Konkret lautet die Fragestellung dieser Analyse: lassen sich Störungen der Lymphozytenfunktion bereits aus einer verminderten Reaktion auf eines der Lektine (z.B. PHA) ableiten (Korrelation der Reaktionen), oder können die Reaktionen auf die drei Lektine unterschiedlich ausfallen (Dissoziation der Reaktionen).

PHA, Con A und PWM stimulieren verschiedene Lymphozyten-Subpopulationen. Durch PHA und Con A werden nur T-Lymphozyten, durch PWM T- und B-Lymphozyten stimuliert (51, 52, 53). Dies trifft jedoch nur für gereinigte B- bzw. T-Zellpopulationen und nur bei Verwendung löslicher Mitogene zu.

In Mischzellkulturen (54,11) oder bei Stimulation mit gebundenem Mitogen (55,10) können auch B-Zellen auf PHA und Con A reagieren.

Innerhalb der B- und T-Zellen gibt es weitere Untergruppen, die sich durch die verschiedenen Mitogene unterschiedlich gut stimulieren lassen. Stobo und Paul (56) fanden 1973 zwei T-Zelluntergruppen, die sich unter anderem in Funktion, Lokalisation, Strahlensensibilität und der Menge an θ -Determinanten unterscheiden. Zellen mit vielen θ -Determinanten antworten auf PHA und Con A etwa gleich stark, Zellen mit wenig θ -Determinanten antworten auf Con A stark und auf PHA sehr schwach. Einige Jahre später führten eine Reihe von Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß Helfer-T-Zellen wenig θ -Antigen auf ihrer Oberfläche tragen (57) und nur auf Con A und zwar besonders stark auf niedrige Dosen dieses Mitogens ansprechen (58), während optimal mitogen wirkende Dosen von Con A, PHA und PWM Suppressor-T-Zellen, Zellen mit viel θ -Antigen, aktivieren (59-62).

Die Zellen mit der höchsten θ -Dichte im Thymus jedoch, die Cortison-sensitiven, unreifen kortikalen Zellen, antworten nicht auf PHA, aber auf Con A. Die Cortison-resistenten, reifen medullären Thymuszellen dagegen reagieren auf beide Mitogene (17, 63, 64).

Auch andere Oberflächenantigene können verschiedenen T-Zell-subpopulationen zugeordnet werden und somit zur Erforschung der Mitogenempfindlichkeit von Zellen beitragen. Zellen, die das Antigen Lyt 1 tragen, wurden als Helferzellen, solche mit den Antigenen Lyt 2 und 3, die stets gemeinsam auftreten, als Killer- und Suppressorzellen identifiziert (65, 66). Zellen, die das Antigen Qa-1 tragen, sind Suppressorzellen (67). Die durch Entfernung dieser einzelnen Zellpopulationen mit Hilfe der jeweiligen spezifischen Antikörper und Stimulation der Restzellen mit PHA oder Con A gewonnenen Ergebnisse (65, 66, 68) bestätigen die oben beschriebene Erkenntnis, daß Helfer-T-Zellen nur durch Con A, Suppressor-T-Zellen durch Con A und PHA stimuliert werden können.

Neben den Helfer- und Suppressor-T-Zellen aktiviert Con A auch Lymphotoxin produzierende Killer- oder Effektor-T-Zellen, die nicht auf PHA reagieren (69).

Daß Killerzellen nur durch Con A und nicht durch PHA stimuliert werden, zeigte auch Stobo (17, 64) und zwar anhand der Graft-versus-host-Reaktion und der primär gemischten Lymphozytenreaktion. Bei diesen beiden Reaktionen antworten die verstärkenden bzw. die blastenbildenden Zellen auf beide Mitogene etwa gleich gut (17, 64), bei der primär gemischten Lymphozytenreaktion zeigten sich neben den Killerzellen auch die Gedächtniszellen als PHA-unempfindlich (70).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß fast alle T-Zellen auf Con A reagieren, während PHA nur einen kleinen Teil der Con A-empfindlichen Zellen aktiviert. Es gibt jedoch auch Fälle, in denen die PHA-Reaktion wesentlich stärker als die Con A-Reaktion ist.

Zytolyse von Zellen z.B., die den Fc-Rezeptor (71) oder das Ia-Antigen tragen (72, 73, 74) hinterläßt eine Restzellpopulation, die gut auf PHA und relativ schwach auf Con A antwortet.

Antigen-Antikörper-Komplexe hemmen die Con A- aber nicht die PHA-induzierte T-Zellproliferation (75).

Nach Trennung peripherer Lymphozyten auf einem Rinderserum-albumingradienten reagiert die leichteste Fraktion auf beide Mitogene, in den höheren Dichtefractionen geht die Con A-Empfindlichkeit verloren, die PHA-Empfindlichkeit wird beibehalten (76).

Die Wirkung von PWM wurde wesentlich seltener mit der Wirkung anderer Mitogene verglichen. Hier sei nur genannt, daß Daguiard (51) Thymuszellen auf einem diskontinuierlichen Albumingradienten trennte und auf PHA reagierende Zellen nur in der am wenigsten dichten Fraktion, auf PWM reagierende Zellen vor allem in den mittleren Fraktionen fand.

Neben den hier aufgeführten findet man eine Reihe von weiteren Arbeiten über Unterschiede in der Stimulierbarkeit von Lymphozytenpopulationen, die durch verschiedene biochemische oder immunologische Verfahren getrennt wurden (77-81).

Da es also Lymphozytensubpopulationen gibt, die auf PHA, Con A und PWM unterschiedlich reagieren und da die in unserer Studie untersuchten Patienten an ganz verschiedenen immunologischen und nicht-immunologischen Erkrankungen mit möglicherweise unterschiedlicher Beeinträchtigung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen leiden, war zu erwarten, daß die Reaktion der Lymphozyten auf die drei Mitogene bei einigen der Patienten dissoziiert sein könnte. Wir haben deshalb mit Hilfe der Stimulationsquotienten (PHA/Con A, PHA/PWM und Con A/PWM) die Relation der Lymphozytenreaktionen für alle Probanden (Gesunde und Patienten) bestimmt und Normalbereiche und pathologische Bereiche festzulegen versucht. In der Gesamtgruppe schwankten die drei Stimulationsquotienten über einen relativ weiten Bereich (Abb. 5.1.1, 5.1.2 und 5.1.3). Die jeweiligen (von uns definierten) Normbereiche, in denen 98 % der Quotienten der Kontrollpersonen liegen, sind in allen drei Fällen deutlich enger als die Bereiche aller Probanden: Der Normbereich liegt für PHA/Con A zwischen 0,4 und 1,3; für PHA/PWM zwischen 0,8 und 3,3 und für Con A/PWM zwischen 0,7 und 4,0. Außerhalb des Normbereichs befinden sich 13,7 % bzw. 12,5 % bzw. 12,0 % der Quotienten aller untersuchten Probanden.

Jede der wiederholt untersuchten Kontrollpersonen weist höchstens einmal einen der drei Quotienten außerhalb des Normbereichs auf, ausgenommen eine 14 mal getestete Probandin (vgl. 5.3.1), bei der zwei Untersuchungen jeweils einen Quotienten außerhalb des Normbereichs ergeben. Wir haben nie beobachtet, daß zwei oder alle drei Quotienten bei einer Kontrollperson außerhalb der Normbereiche lagen. Bei den Probanden in der Kontrollgruppe ist also eine große Konstanz der Untersuchungsergebnisse zu beobachten.

Bei mehrfach untersuchten Patienten oder bei Patientengruppen mit gleicher oder ähnlicher Diagnose fällt dagegen ein wiederholtes Abweichen einunddesselben Stimulationsquotienten in die gleiche Richtung auf. So lassen sich z.B. Lymphozyten von Kindern mit ALL vor Beginn der Therapie oder mit Zöliakie im Vergleich zu Gesunden relativ besser durch PHA als durch Con A oder PWM stimulieren. Bei Kindern mit primären oder sekundären Immundefizienzen läßt sich dagegen häufig eine relativ bessere Reaktion auf Con A und PWM als auf PHA beobachten (vgl. 5.1.1 und 5.1.2).

Nicht nur außerhalb, auch am Rande des Normbereichs finden sich wiederholt bestimmte Probanden. Ein Beispiel ist der unter 5.3.4 beschriebene, an einer autoimmunhämolytischen Anämie erkrankte Patient, dessen PHA/Con A-Quotient bei 6 von 7 Untersuchungen den unteren Grenzwert von 0,4 erreicht. Man braucht freilich keine Stimulationsquotienten zu berechnen, um die stark gestörte Lymphozytenfunktion dieses Patienten zu erkennen. Hier und in vielen anderen Fällen läßt bereits die extrem verminderte Reaktion auf PHA, Con A und PWM auf eine Lymphozytenfunktionsstörung schließen.

Gibt es nun aber Fälle, in denen die Antwort auf PHA normal, die Stimulationsquotienten jedoch vermindert oder erhöht sind? Es ist im Einzelfall oft schwer zu entscheiden, ob die Antwort auf PHA als "normal" angesehen werden kann oder nicht, da es keine absoluten Normwerte für die Stärke der Reaktion auf die Mitogene gibt. Die Untersuchungen im Immunologischen Labor der Kinderklinik haben ergeben, daß eine 3H-Thymidinaufnahme unter 20.000 cpm als auffällig anzusehen ist. In dieser Studie wurde dieser Wert in

37 % aller Untersuchungen (n=678) und in 17 % der Kontrolluntersuchungen (n=91) nicht erreicht. Als eindeutig zu niedrige Reaktion bezeichnen wir eine Reaktion unter 10.000 cpm. In dieser Studie wurden solche Werte in 14 % aller Untersuchungen und 2 % bei der Kontrollgruppe beobachtet. Vergleichen wir nun diese Werte mit den Abweichungen der Quotienten von der Norm, so ergibt sich folgendes: Von 26 % aller Untersuchungen, bei denen ein oder mehrere Quotienten außerhalb des Normbereichs liegen, ist die Antwort auf PHA bei 9 % kleiner als 10.000 cpm (und bei 16 % kleiner als 20.000 cpm). Das heißt, wenn man nur die cpm 3H-Thymidinaufnahme der Lymphozyten nach PHA-Stimulation und nicht die Quotienten bestimmt hätte, wären bei 10.000 cpm Grenzwert 17 % der Probanden (26-9 %) und bei 20.000 cpm Grenzwert 10 % (26-16 %) der Probanden als normal bezeichnet worden, obwohl ein oder mehrere Quotienten außerhalb des Normbereichs liegen.

Wie oft die einzelnen Stimulationsquotienten ober- und unterhalb des Normbereichs liegen und welche Kombinationen erhöhter und verminderter Quotienten vorkommen, ist aus Tabelle 6a und 6b ersichtlich. Dabei zeigt sich, daß die Quotienten PHA/Con A und PHA/PWM bei den Patienten mit schwacher PHA-Reaktion (< 10.000 cpm)*häufiger zu niedrig als zu hoch (29 gegenüber 15 bzw. 22 gegenüber 11) und bei den Patienten mit besserer PHA-Reaktion (> 10.000 cpm)**häufiger zu hoch als zu niedrig sind (45 gegenüber 10 bzw. 45 gegenüber 11). Der Con A/PWM-Quotient ist bei beiden Gruppen wesentlich häufiger erhöht als vermindert (bei < 10.000 cpm 25 gegenüber 7 und bei > 10.000 cpm 48 gegenüber 1).

Betrachtet man die Kombinationen außerhalb des Normbereichs liegender Stimulationsquotienten, so ergeben sich folgende Zahlen: Bei geringer Reaktion auf PHA (< 10.000 cpm; n=92, also 14 % aller Untersuchungen) treten zu niedrige Quotienten mit PHA im Zähler (PHA/Con A ↓ und/oder PHA/PWM ↓) 34 mal auf; erhöhte PHA/Con A- und/oder PHA/PWM-Quotienten kommen nur 21 mal vor. Bei 8 Untersuchungen ist allein der Quotient Con A/

*(Tab. 6a)

** (Tab. 6b)

Tab. 6a

Stimulationsquotienten oberhalb ($\uparrow$) und unterhalb ($\downarrow$) des Normbereichs bei Probanden mit weniger als 10.000 cpm mittlerer 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA ($n = 92 \pm 14$ % aller Untersuchungen):

Quotient	Anzahl	Quotient	Anzahl	Quotient	Anzahl
PHA/Con A $\uparrow$	15	PHA/PWM $\uparrow$	11	Con A/PWM $\uparrow$	25
PHA/Con A $\downarrow$	29	PHA/PWM $\downarrow$	22	Con A/PWM $\downarrow$	7

Dabei kommen folgende Kombinationen vor:

Kombinationen, bei denen PHA/ConA und/oder PHA/PWM erhöht ist

Kombinationen, bei denen PHA/Con A und/oder PHA/PWM vermindert ist

Quotient(en)	Anzahl	Quotient(en)	Anzahl
nur PHA/Con A $\uparrow$	7	nur PHA/Con A $\downarrow$	4
nur PHA/PWM $\uparrow$	1	nur PHA/PWM $\downarrow$	4
PHA/Con A $\uparrow$ und PHA/PWM $\uparrow$	1	PHA/Con A $\downarrow$ und PHA/PWM $\downarrow$	14
PHA/PWM $\uparrow$ und Con A/PWM $\uparrow$	5	PHA/PWM $\downarrow$ und Con A/PWM $\downarrow$	1
PHA/Con A $\uparrow$, PHA/PWM $\uparrow$ u. Con A/PWM $\uparrow$	2	PHA/Con A $\downarrow$, PHA/PWM $\downarrow$ und Con A $\downarrow$	1
PHA/Con A $\uparrow$ und Con A/PWM $\downarrow$	3	PHA/Con A $\downarrow$ und Con A/PWM $\uparrow$	8
PHA/Con A $\uparrow$ PHA/PWM $\uparrow$ u. Con A/PWM $\downarrow$	2	PHA/Con A $\downarrow$, PHA/PWM $\downarrow$ und Con A/PWM $\uparrow$	2
zusammen	21	zusammen	34

In 8 Fällen ist nur Con A/PWM erhöht; d.h. in insgesamt 63 Fällen (21 + 34 + 8) liegen ein oder mehrere Quotienten außerhalb des Normbereichs, in 29 Fällen (92 - 63) liegen alle Quotienten im Normbereich.

Tab. 6b

Stimulationsquotienten oberhalb (↑) und unterhalb (↓) des Normbereichs bei Probanden mit mehr als 10.000 cpm mittlerer 3H-Thymidinaufnahme nach Stimulation mit PHA (n=586 $\hat{=}$ 86 % aller Untersuchungen)

Quotient	Anzahl	Quotient	Anzahl	Quotient	Anzahl
PHA/Con A ↑	45	PHA/PWM ↑	45	Con A/PWM ↑	48
PHA/Con A ↓	10	PHA/PWM ↓	11	Con A/PWM ↓	1

Dabei kommen folgende Kombinationen vor:

Kombinationen, bei denen PHA/Con A und/oder PHA/PWM erhöht ist

Kombinationen, bei denen PHA/Con A und/oder PHA/PWM vermindert ist

Quotient(en)	Anzahl	Quotient(en)	Anzahl
nur PHA/Con A ↑	33	nur PHA/Con A ↓	5
nur PHA/PWM ↑	10	nur PHA/PWM ↓	8
PHA/Con A ↑ und PHA/PWM ↑	9	PHA/Con A ↓ und PHA/PWM ↓	3
PHA/PWM ↑ und Con A/PWM ↑	24	PHA/Con A ↓ und Con A/PWM ↑	2
PHA/Con A ↑, PHA/PWM ↑ und Con A/PWM ↑	2		
PHA/Con A ↑ und Con A/PWM ↓	1		
zusammen	79	zusammen	18

In 20 Fällen ist nur Con A/PWM erhöht; d.h. in 117 Fällen (79 + 18 + 20) liegen ein oder mehrere Quotienten außerhalb des Normbereichs, in 469 Fällen (586 - 117) liegen alle Quotienten im Normbereich.

PWM erhöht. In den übrigen 29 Fällen, d.h. in knapp einem Drittel, liegen alle Quotienten im Normbereich. Bei normaler Reaktion auf PHA dagegen (> 10.000 cpm; $n=586$, d.h. 86 % aller Untersuchungen) ist PHA/Con A und/oder PHA/PWM nur 18 mal zu niedrig aber 79 mal zu hoch. In 20 Fällen ist nur Con A/PWM erhöht. Normale Stimulationsquotienten finden sich hier 469 mal, d.h. in 4/5 der Fälle.

Das bedeutet zwar, daß eine geringe PHA-Reaktion häufig mit auffälligen Quotienten und eine normale PHA-Reaktion häufig mit normalen Quotienten einhergeht, aber auch, daß 1/5 der Probanden mit einer PHA-Reaktion über 10.000 cpm (oder 17 % aller Probanden, s.o.) fälschlich als normal bezeichnet worden wären, hätte man nur mit PHA stimuliert und keine Quotienten gebildet.

Dieser Vergleich stellt die Reaktion auf PHA (in cpm) den Quotienten gegenüber. Wie verhielten sich jedoch die Reaktionen auf Con A und PWM (in cpm) zu der auf PHA?

	Unter- suchungen
PHA < 10.000 , Con A < 14.000 , PHA/Con A im Normbereich	35
PHA < 10.000 , Con A > 14.000 , PHA/Con A im Normbereich	13
PHA < 10.000 , Con A < 14.000 , PHA/Con A ↓	9
PHA < 10.000 , Con A > 14.000 , PHA/Con A ↓	20
PHA < 10.000 , Con A < 14.000 , PHA/Con A ↑	+15
	92
PHA > 10.000 , Con A < 14.000 , PHA/Con A im Normbereich	24
PHA > 10.000 , Con A > 14.000 , PHA/Con A ↓	10
PHA > 10.000 , Con A < 14.000 , PHA/Con A ↑	17
PHA > 10.000 , Con A > 14.000 , PHA/Con A ↑	+28
	79

PHA > 10.000 , Con A > 14.000 , PHA/Con A im Normbereich
bei $678 - (92 + 79) = 507$ Untersuchungen.

	Unter- suchungen
PHA < 10.000, PWM < 7.000, PHA/PWM im Normbereich	50
PHA < 10.000, PWM > 7.000, PHA/PWM im Normbereich	9
PHA < 10.000, PWM < 7.000, PHA/PWM ↓	13
PHA < 10.000, PWM > 7.000, PHA/PWM ↓	9
PHA < 10.000, PWM < 7.000, PHA/PWM ↑	+ 11 92

PHA > 10.000, PWM < 7.000, PHA/PWM im Normbereich	30
PHA > 10.000, PWM > 7.000, PHA/PWM ↓	11
PHA > 10.000, PWM < 7.000, PHA/PWM ↑	29
PHA > 10.000, PWM > 7.000, PHA/PWM ↑	+ 16 86
PHA > 10.000, PWM > 7.000, PHA/PWM im Normbereich bei 678 = (92 + 86) = 500 Untersuchungen.	

Hätten wir nur mit PHA stimuliert und als unteren Grenzwert 10.000 cpm angenommen, so wären uns 92 Untersuchungsergebnisse aufgefallen (14 % aller Untersuchungen). Wenn wir nun bei diesen 92 Befunden die Reaktion auf Con A absolut oder als Quotient PHA/Con A genauer betrachten, so ergibt sich folgendes: von den 92 PHA-Hyporeaktiven reagieren 35+9+15 = 59 auch auf Con A mit niedrigen Werten. 13 mal kann die Reaktion auf Con A ebenfalls nicht besonders hoch gewesen sein, da der PHA/Con A-Quotient im Normbereich liegt. Insgesamt haben von den 92 also 72 auf Con A ebenfalls schwach reagiert, d.h. mit anderen Worten von den 92 PHA-Hyporeaktiven bleiben 20, die nicht auch auf Con A hyporeaktiv sind. Bei diesen handelt es sich um Patienten mit verschiedenen Krankheiten (Tab. 6c), eine Häufung bestimmter Diagnosen läßt sich nicht feststellen.

Betrachten wir nun die Beziehung zwischen PWM und PHA auf die gleiche Weise: von den 92 PHA-Hyporeaktiven haben (50+13+11= 74) auf PWM ebenfalls schwach reagiert. Bei den verbleibenden 18 liegt der PHA/PWM-Quotient 9 mal im Normbereich, d. h. auch die PWM-Reaktion kann nicht besonders hoch gewesen sein. Es bleiben 9 Untersuchungen mit einer echten PHA-PWM-Dissoziation, von denen 8 bereits durch eine starke PHA-Con A-Dissoziation aufgefallen waren. Auch diese Probanden zeigen keine Häufung bestimmter Erkrankungen (Tab. 6d).

Tab. 6c

Untersuchungsergebnisse und Diagnosen der Probanden mit verminderter PHA-Reaktion (<10.000 cpm), normaler ConA-Reaktion (>14.000 cpm) und vermindertem PHA/ConA-Quotienten ($<0,4$).

PHA (cpm)	ConA (cpm)	PHA/ConA	Diagnose
5.577	17.484	0,3	Kontrolle von auswärts
2.990	17.607	0,2	Kontrolle von auswärts
7.475	32.032	0,2	Kontrolle von auswärts
7.957	25.736	0,3	Kontrolle von auswärts
3.525	15.721	0,2	Angehöriger
7.088	20.491	0,3	Angehöriger
7.123	24.859	0,3	Angehöriger
3.085	17.363	0,2	Angehöriger
2.649	16.602	0,2	rezidivierende Infekte
5.892	35.300	0,2	Bruton
7.788	38.700	0,2	ALL nach Ende der Therapie
5.759	24.629	0,2	ALL nach Ende der Therapie
8.717	28.200	0,3	M. Hodgkin
8.604	54.254	0,2	Wilmstumor
7.833	26.399	0,3	Dermatomyositis
3.267	19.104	0,2	Eosinophilie
2.411	15.134	0,2	juvenile chronische Arthritis
3.389	14.307	0,2	Bronchiectasen
8.404	25.617	0,3	chron. asthmoide Bronchitis
5.178	34.068	0,2	IgA-Mangel, Eosinophilie M. Wissler, Tbc

Tab. 6d

Untersuchungsergebnisse und Diagnosen der Probanden mit verminderter PHA-Reaktion (<10.000 cpm), normaler PWM-Reaktion (>7.000 cpm) und vermindertem PHA/PWM-Quotienten ($<0,8$).

PHA (cpm)	PWM (cpm)	PHA/PWM	Diagnose
2.990	8.037	0,4	Kontrolle von auswärts
7.475	12.527	0,6	Kontrolle von auswärts
5.892	14.498	0,4	Bruton
8.594	17.652	0,5	ALL nach Induktion
7.788	13.924	0,6	ALL nach Ende der Therapie
5.759	15.533	0,4	ALL nach Ende der Therapie
8.604	12.885	0,7	Wilmstumor
8.404	40.105	0,2	chron. asthmoide Bronchitis
5.178	7.094	0,7	IgA-Mangel, Eosinophilie M. Wissler, Tbc

Wenn wir nur mit PHA stimuliert hätten und als unteren Grenzwert 10.000 cpm angenommen hätten, so wären uns 79 Untersuchungen nicht aufgefallen, bei denen Con A absolut niedrig (24+17) oder relativ niedrig (28) oder relativ hoch (10) ist. Bei 24 dieser Untersuchungen können die Reaktionen auf PHA und Con A nicht besonders stark dissoziiert sein, da der Quotient im Normbereich liegt. 10+28 Untersuchungen fallen nur durch den Quotienten auf. Bei diesen ist bei normaler PHA-Reaktion die Reaktion auf Con A ebenfalls normal, liegt aber 10 mal deutlich über und 28 mal deutlich unter der PHA-Reaktion. Es bleiben 17 Untersuchungen mit PHA-Con A-Dissoziation mit bereits an den cpm meßbaren Defekten (Tab. 6e). 7 dieser 17 Untersuchungen (41 %) wurden an von außerhalb zugeschickten Blutproben gesunder Personen vorgenommen, allerdings befanden sich unter diesen 7 Blutproben 4 eines insgesamt 6 mal untersuchten Probanden. Der Anteil an Untersuchungen gesunder Probanden von auswärts an allen Untersuchungen beträgt nur 6 %.

Hätten wir nur mit PHA stimuliert und als unteren Grenzwert 10.000 cpm angenommen, so wären uns 86 Untersuchungen nicht aufgefallen, bei denen PWM absolut niedrig (30+29) oder relativ niedrig (16) oder relativ hoch (11) ist.

Bei 30 dieser Untersuchungen können die Reaktionen auf PHA und PWM nicht besonders stark dissoziiert gewesen sein, da der Quotient im Normbereich liegt. Nur durch die Quotienten fallen 11+16 Untersuchungen auf.

Es bleiben 29 Untersuchungen mit echter PHA-PWM-Dissoziation bei zu niedrigem PWM (Tab. 6f), von denen 6 bereits eine starke PHA-Con A-Dissoziation zeigten. Hier kommen zwei Diagnosen besonders häufig vor: 6 Untersuchungen an Patienten mit ALL vor Einleitung der zytostatischen Therapie (21 % gegenüber 4 % in der Gesamtgruppe) und 3 von insgesamt 4 Untersuchungen an einer Patientin mit Löffler Syndrom ergaben verminderte PWM-Werte bei normaler PHA-Reaktion und erhöhtem Quotienten.

Tab. 6e

Untersuchungsergebnisse und Diagnosen der Probanden mit normaler PHA-Reaktion (>10.000 cpm), verminderter ConA-Reaktion (<14.000 cpm) und erhöhtem PHA/ConA-Quotienten ($>1,3$)

PHA (cpm)	ConA (cpm)	PHA/ConA	Diagnose
13.768	6.018	2,3	Kontrolle von auswärts
15.751	10.255	1,5	Kontrolle von auswärts
21.210	10.807	2,0	Kontrolle von auswärts
20.216	11.973	1,7	Kontrolle von auswärts
20.948	10.510	2,0	Kontrolle von auswärts
21.211	12.447	1,7	Kontrolle von auswärts
13.123	8.934	1,5	Kontrolle von auswärts
18.089	8.925	2,0	Angehöriger
15.889	10.707	1,5	rezidivierende Infekte
18.991	13.166	1,4	rezidivierende Infekte
21.370	7.725	2,8	Wiskott-Aldrich-Syndrom
17.779	10.181	1,7	ALL vor Therapie
15.185	1.662	9,1	ALL vor Therapie
26.750	6.083	4,4	ALL nach ZNS-Bestrahlung
14.203	8.532	1,7	Lymphosarkom
21.009	12.419	1,7	juvenile chronische Arthritis
32.190	6.674	4,8	Zöliakie

Tab. 6f

Untersuchungsergebnisse und Diagnosen der Probanden mit normaler PHA-Reaktion (> 10.000 cpm), verminderter PWM-Reaktion (< 7.000 cpm) und erhöhtem PHA/PWM-Quotienten ($> 3,3$).

PHA (cpm)	PWM (cpm)	PHA/PWM	Diagnose
20.216	5.239	3,9	Kontrolle von auswärts
13.763	3.309	4,2	Angehöriger
18.089	3.689	4,9	Angehöriger
20.733	5.874	3,5	Angehöriger
21.760	3.445	6,3	Angehöriger
11.029	3.012	3,7	rezidivierende Infekte
26.770	4.839	5,5	IgA-Mangel
21.370	6.344	3,4	Wiskott-Aldrich-Syndrom
10.864	3.087	3,5	ALL vor Therapie
15.251	4.227	3,6	ALL vor Therapie
18.180	5.141	3,5	ALL vor Therapie
15.185	1.020	14,9	ALL vor Therapie
40.187	6.644	6,0	ALL vor Therapie
14.560	4.233	3,4	ALL vor Therapie
26.750	2.771	9,7	ALL nach ZNS-Bestrahlung
12.399	2.177	5,7	ALL nach Ende der Therapie
12.816	2.930	4,4	ALL nach Ende der Therapie
12.865	1.874	6,9	M. Hodgkin
20.394	5.545	3,7	Lymphom
37.936	222	170,9	aplastische Anämie
16.374	4.693	3,5	Löffler Syndrom
10.992	2.966	3,7	Löffler Syndrom
14.388	3.826	3,8	Löffler Syndrom
13.835	3.971	3,5	juvenile chronische Arthritis
13.400	2.391	5,6	juvenile chronische Arthritis
18.497	4.682	4,0	juvenile chronische Arthritis
14.309	2.080	6,9	Zöliakie
32.190	119	270,5	Zöliakie
24.278	6.811	3,6	zystische Fibrose

Der Vergleich der absoluten Reaktionen (in cpm) auf Con A und PWM wie auch der Quotienten mit der PHA-Reaktion ergibt also nur bei 5,5 % aller Untersuchungen (20+17) eine starke PHA-Con A-Dissoziation und bei 5,6 % (9+29) eine starke PHA-PWM-Dissoziation, er zeigt aber auch, daß bei Stimulation mit PHA allein ohne die Verwendung von Con A 11,7 % (79) und ohne die Verwendung von PWM 12,7 % (86) aller Untersuchungen zu Unrecht als normal bezeichnet worden wären.

Zwar zeigt sich bei den Probanden mit starker PHA-Con A- oder PHA-PWM-Dissoziation meist keine sehr eindrucksvolle Häufung bestimmter Diagnosen, es wurde jedoch in Kapitel 5 beschrieben, daß Patienten mit der gleichen Erkrankung untereinander häufig ähnliche Muster der Reaktivität auf die drei Mitogene aufweisen. Dies mag auf der unterschiedlichen Stimulierbarkeit der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen durch PHA, Con A und PWM beruhen, die durch zahlreiche Literaturstellen belegt wird (s.o.). Die Stimulation mit allen drei Mitogenen - PHA, Con A und PWM - lohnt sich also durchaus und soll auch weiterhin durchgeführt werden.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Analyse versucht, für die immunologische Untersuchungsmethode der induzierten Lymphoproliferation eine bessere Standardisierung und Normierung zu erarbeiten. In einem Zeitraum von 16 Monaten wurden an 547 Probanden insgesamt 678 Lymphozyten-Stimulations-Untersuchungen vorgenommen und zwar

- a) 346 Untersuchungen an 279 Patienten mit immunologischen und nicht-immunologischen Erkrankungen,
- b) 241 Untersuchungen an 217 klinisch gesunden Personen, die nicht zu den eigentlichen Kontrollpersonen (s.u.) gerechnet wurden, da sie mit den Patienten verwandt waren oder die Blutprobe von außerhalb zugeschickt wurde und deshalb die Zellen nicht sofort untersucht werden konnten und
- c) 91 Untersuchungen an 51 Kontrollpersonen, d.h. Personen, die klinisch gesund und mit den Patienten nicht verwandt waren und deren Zellen am Tag der Blutentnahme untersucht wurden.

Das Prinzip der Untersuchung besteht darin, daß Lymphozyten in Suspensionskulturen mit drei Mitogenen, dem Phytohämagglutinin (PHA), dem Concanavalin A (Con A) und dem Pokeweed Mitogen (PWM) zur Proliferation stimuliert werden und deren Stärke mittels der ^3H -Thymidin-Inkorporation in die DNS der Zellen bestimmt wird. In dieser Analyse werden aus den so gewonnenen Daten (counts pro Minute ^3H -Thymidinaufnahme, induziert durch jedes der Mitogene) "Stimulationsquotienten" errechnet und zwar die Stimulationsquotienten PHA/Con A, PHA/PWM und Con A/PWM. Die so mathematisch definierte Beziehung der Reaktivität der Lymphozyten auf verschiedene Stimuli sollte es ermöglichen, pathologische von normaler Reaktivität abzugrenzen, wenn möglich typische Muster der Reaktivität bei bestimmten Erkrankungen zu finden und schließlich die Frage zu beantworten, ob sich Störungen der Lymphozytenfunktion bereits aus einer verminderten Reaktion auf eines der Lektine (z.B. PHA) ableiten lassen (Korrelation der Reaktionen) oder ob die Reaktionen auf die drei Lektine unterschiedlich ausfallen können (Dissoziation der Reaktionen).

Die große Streubreite in den Häufigkeitsverteilungen der drei Stimulationsquotienten brachte bereits Dissoziationen zwischen den Reaktionen auf die einzelnen Mitogene zum Ausdruck. Der Bereich, in dem 98 % der Quotienten der Kontrollpersonen liegen, ist in allen drei Fällen deutlich schmaler als der Gesamtbereich und wurde als Normbereich bezeichnet. Er liegt für PHA/Con A zwischen 0,4 und 1,3, für PHA/PWM zwischen 0,8 und 3,3 und für Con A/PWM zwischen 0,7 und 4,0. Außerhalb des Normbereichs befinden sich 13,7 % bzw. 12,5 % und 12,0 % der Quotienten aller untersuchten Probanden.

Dabei zeigten Patienten mit der gleichen Erkrankung häufig ein zueinander ähnliches, von der Norm abweichendes Verhalten ihrer Stimulationsquotienten: Alle drei Quotienten liegen bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie - vor Einleitung der zytostatischen Therapie - und bei an Zöliakie erkrankten Kindern überdurchschnittlich oft oberhalb des Normbereichs; bei Kindern mit primären oder sekundären Immundefizienzen traten überdurchschnittlich oft PHA/Con A- und PHA/PWM-Quotienten unterhalb des Normbereichs auf.

Bei einzelnen, mehrfach untersuchten Patienten konnten Änderungen der Stimulationsquotienten in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf festgestellt werden, so nach Knochenmarktransplantation und während einer Graft-versus-Host-Reaktion.

17 % aller Untersuchungen ergaben Abweichungen der Stimulationsquotienten von der Norm bei normaler PHA-induzierter Lymphoproliferation, wären also bei der früher üblichen ausschließlichen Stimulation mit PHA (ohne die Verwendung von Con A und PWM) übersehen worden.

Diese drei Gründe - Abweichung der Quotienten bei bestimmten Erkrankungen, charakteristisches Verlaufsmuster nach Immunrestitution und die Möglichkeit zur Entdeckung von partiellen Immunstörungen - zeigen an, daß zu einer sorgfältigen Immun Diagnostik die Stimulation mit den drei Lektinen notwendig und der damit verbundene Arbeitsaufwand gerechtfertigt ist.

Literaturverzeichnis

- 1) SHARON, N., LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949 - 959 (1972)
- 2) LIS, H., SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem. 42, 541 - 574 (1973)
- 3) GILBOA-GARBER, N., MIZRAHL, L., GARBER, N. Purification of the galactose binding hemagglutinin of pseudomonas aeruginosa by affinity chromatography using sepharose. F. E. B. S. Letters 28, 93 -95 (1972)
- 4) HAMMARSTROM, S. Snail (Helix pomatia) hemagglutinin. Met. Enzymol. 28, 368 - 383 (1972)
- 5) BEZKOROVAINY, A., SPRINGER, G.F., DESAI, P.R. Physico-chemical properties of the eel antihuman blood-group H (O) antibody. Biochemistry 10, 3761 - 3764 (1971)
- 6) NOVOGRODSKY, A., ASHWELL, G. Lymphocyte mitogenesis induced by a mammalian liver protein that specifically binds desialylated glycoproteins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 676 (1977)
- 7) KIEDA, C.M.T., BOWLES, D.J., RAVID, A., SHARON, N. Lectins in lymphocyte membranes. F.E.B.S. Lett. 94, 391 (1978)
- 8) KOLB, H., KOLB-BACHHOFEN, V. A lectin-like receptor on mammalian macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 678 (1978)

- 9) ANDERSON, J., SJOBERG, O., MOLLER, G. Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. Transplant. Rev. 11, 131 - 177 (1972)
- 10) GREAVES, M.F., BAUMINGER, S. Activation of T and B lymphocytes by insoluble phytomitogens. Nature New Biol. 234, 67 - 70 (1972)
- 11) GREAVES, M.F., JANOSSY, G. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. Transplant. Rev. 11, 87 (1972)
- 12) MILLER, B.J., NOYES, C., HEINRIKSON, R., KINGDON, H.S., YACHNIN, S. PHA mitogenic proteins. Structural evidence for a family of isomitogenic proteins. I. Exptl. Med. 138, 939 (1973)
- 13) NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Research 20, 462 - 466 (1960)
- 14) PHILLIPS, B., WEISROSE E. The mitogenic response of human B lymphocytes to phytohemagglutinin. Clin. Exp. Immunol. 16, 383 - 392 (1974)
- 15) RUDDON, D.E., WEISENTHAL, L.M., LUNDEEN, D.E., BESSLER, W., GOLDSTEIN, I.I. Stimulation of mitogenesis in normal and leukemic human by lima bean lectins. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1848 - 1851 (1974)
- 16) SCHUMANN, G., SCHNEBLI, H.P., DUKOR, P. Selective stimulation of mouse lymphocyte populations by lectins. Int. Arch. Allergy 45, 331 - 340 (1973)

- 17) STOBO, J.D. Phytohemagglutinin and Concanavalin A: Probes for murine T cell activation and differentiation. Transplant. Rev. 11, 60 - 86 (1972)
- 18) YACHNIN, S., SVENSON, R.H. The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. Immunology 22, 871 (1972)
- 19) ETZLER, M., KABAT, E.A. Purification and characterization of a lectin (Plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichos biflorus*. Biochemistry 9, 869 - 877 (1970)
- 20) MATSUMOTO, J., OSAWA, T. Purification and characterization of an anti-H (O) phytohemagglutinin of *Ulex europaeus*. Biochem. Biophys. Acta 194, 180 - 189 (1969)
- 21) BURGER, M.M., NOONAN, K.D. Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumour cell surface. Nature 228, 512 - 515 (1970)
- 22) LIN, H., BRUCE, W.R. Selective action of concanavalin A on transplanted tumours of the mouse. Proc. Amer. Assoc. Cancer Research 12, 66 (1971)
- 23) SHOHAM, J., INBAR, M., SACHS, L. Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumour development in vivo by concanavalin A. Nature 227, 1244 - 1246 (1970)
- 24) EGAN, H.S., REEDER, W.J., EKSTEDT, R.D. Effect of concanavalin A in vivo in suppressing the antibody response in mice. I. Immunology 112, 63 - 69 (1974)

- 25) RIGAS, D.A., OSGOOD, E.E. Purification and properties of the PHA of *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 212, 607 (1955)
- 26) WEBER, T.H. Isolation and characterization of a lymphocyte-stimulating leucoagglutinin from red kidney beans. Scand. I. Clin. Lab. Invest. suppl. 111, (1969)
- 27) ALLEN, L.W., SVENSON, R.H., YACHNIN, S. Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: Isolation of potent and weak PHAs possessing mitogenic activity. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 63, 334 (1969)
- 28) GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E., MERRICK, J.M. Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. Biochem. Biophys. Acta 97, 68 - 76 (1965)
- 29) GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E., SMITH, E.E. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. Biochemistry 4, 876 - 883 (1965)
- 30) CLARKE, A.E., DENBOROUGH, M.A. The interaction of concanavalin A with blood-group-substance glycoproteins from human secretions. Biochem. I. 121, 811 - 816 (1971)
- 31) DOUGLAS, S.D., KAMIN, R.M., FUDENBERG, H.H. Human lymphocyte response to phyto-mitogens in vitro: normal, agammaglobulinemic and paraproteinemic individuals. I. Immunol. 103, 1185 - 1195 (1969)
- 32) INBAR, M., SACHS, L. Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63, 1418 - 1425 (1969)

- 33) INBAR, M., SACHS, L. Structural difference in sites of the surface membrane of normal and transformed cells. Nature 223, 710 - 712 (1969)
- 34) AGRAWAL, B.B.L., GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction: VII. Physical and chemical studies on concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. Arch. Biochem. Biophys. 124, 218 - 229 (1968)
- 35) OLSON, M.O.J., LIENER, J.E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. Biochemistry 6, 105 - 111 (1967)
- 36) HARDMAN, K.D., WOOD, M.K., SCHIFFER, M. et al. Structure of concanavalin A at 4.25 Ångström resolution. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1393 - 1397 (1971)
- 37) QUIOCHO, F.A., REEKE, G.N., BECKER, J.W. et al. Structure of concanavalin A at 4 Ångström resolution. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1853 - 1857 (1971)
- 38) MC CUBBIN, W.D., KAY, C.M. Molecular weight studies on concanavalin A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 101 - 109 (1971)
- 39) EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., REEKE, G.E., BECKER, J.W., WAXDAL, M.J., WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of con A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 2580 (1972)
- 40) BECKER, J.W., REEKE, G.N., EDELMAN, G.M. Location of the saccharide binding site of concanavalin A. I. Biol. Chem. 246, 6123 - 6125 (1971)

- 41) SUMNER, J.B., HOWELL, S.F. The role of divalent metals in the reversible inactivation of jack bean hemagglutinin. I. Biol. Chem. 115, 583 - 588 (1936)
- 42) AGRAWAL, B.B.L., GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction: XV. The role of bivalent cations in concanavalin A - polysaccharide interaction. Can. J. Biochem. 46, 1147 - 1150 (1968)
- 43) WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G.M. Unusual fragments in the subunit structure of con A. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 1130 (1971)
- 44) FARNES, P., BARKER, B.E., BROWNHILL, L.E., FANGER, H. Mitogenic activity in *Phytolacca americana* (pokeweed). Lancet ii, 1100 (1964)
- 45) REISFELD, R.A., BORJESON, J., CHESSIN, L.N., SMALL, P.A. Isolation and characterization of a mitogen from pokeweed. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58, 2020 (1967)
- 46) ALTMANN, L.C., SNYDERMAN, R., BLAESE, R.M. Abnormalities of chemotactic lymphokine synthesis and mononuclear leukocyte chemotaxis in Wiskott-Aldrich-Syndrome. J. Clin. Invest. 54, 486 - 493 (1974)
- 47) BLAESE, R.M., STROBER, W., WALDMANN, T.A. Immunodeficiency in Wiskott-Aldrich-Syndrome. In: Birth Defects. Orig. Art. Ser. XI, 250 - 254 (1975)
- 48) OPPENHEIM, J.J., BLAESE, R.M., WALDMANN, T.A. Defective lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in Wiskott-Aldrich-Syndrome. J. Immunol. 104, 835 - 844 (1970)

- 49) OPPENHEIM, J.J., BLAESE, R.M., HORTON, J.E., THOR, D.E., GRANGER, G.A. Production of macrophage migration inhibitory factor and lymphotoxin by leukocytes from normal and Wiskott-Aldrich-Syndrome patients. *Cell. Immunol.* 8, 62 - 70 (1973)
- 50) SHERWOOD, A., BLAESE, R.M. Phytohemagglutinin-induced cytotoxic effector lymphocyte function in patients with Wiskott-Aldrich-Syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 13, 515 - 520 (1973)
- 51) DAGUILLARD, F. The differing responses of lymphocytes to mitogens. In: *Proceedings of the Seventh Leukocyte Culture Conference*, F. Daguillard, ed., pp. 573 - 580, Academic Press, New York, London (1973)
- 52) GREAVES, M.F., OWEN, J.J.T., RAFF, M.C. T and B lymphocytes. Origins, properties and roles in immune response. P.86, *Excerpta Medica Amsterdam*, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York (1974)
- 53) LING, N.R., KAY, J.E. Lymphocyte stimulation. Pp. 238 - 242, *North-Holland Publishing Company - Amsterdam - Oxford*, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York (1975)
- 54) ANDERSSON, J., MÖLLER, G., SJOBERG, O. *Eur. J. Immunol.* 2, 99 (1972 a)
- 55) ANDERSSON, J., EDELMAN, G.M., MÖLLER, G., SJOBERG, O. *Eur. J. Immunol.* 2, 233 (1972 b)
- 56) STOBO, J.D., PAUL, W.E. Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as a probe for T cell subsets. *The Journal of Immunology* 110, 362 (1973)

- 57) CANTOR, H., SIMPSON, E., SATO, V.L., FATHMAN, C.G., HERZENBERG, L.A. Characterization of subpopulations of T lymphocytes. 1. Separation and functional studies of peripheral T cells binding different amounts of anti-Thy 1.2 (theta) antibody using a fluorescence - activated cell sorter (FACS). *Cell. Immunol.* 15, 180 (1975)
- 58) PERSSON, U., BICK, P.H., HAMMARSTRÖM, L., MÖLLER, E., SMITH, C.I.E. Different requirements for T cells responding to various doses of concanavalin A. *Scand. J. Immunol.* 8, 219 (1978 b)
- 59) SCAVULLI, J., DUTTON, R.W. Competition between concanavalin A-induced stimulatory and inhibitory effects in the in vitro immune response to antigen. *J. Exp. Med.* 141, 524 (1975)
- 60) SIEGAL, F.P., SIEGAL, M. Enhancement by irradiated T cells of human plasma cell production: Dissection of helper and suppressor functions in vitro. *J. Immunol.* 118, 642 (1977)
- 61) DUTTON, R.W. The nonspecific T cell signal initiates differentiation. In: *Mitogens in Immunobiology*, Oppenheim, J.J., Rosenstreich, D.L., eds., p. 237. Academic Press, New York (1976)
- 62) SAKANE, T., GREEN, J. Human suppressor T cells induced by concanavalin A: Suppressor T cells belong to distinctive T cell subclasses. *J. Immunol.* 119, 1169 (1977)
- 63) JANOSSY, G., GREAVES, M.F. Lymphocyte activation. II. Discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phyto mitogens and heterologous anti-lymphocyte sera. *Clin. Exp. Immunol.* 10, 525 (1972)

- 64) STOBO, J.D. Use of lectins as probes for lymphocyte structure and function. In: The Lymphocyte: Structure and Function, Part II, Marchalonis, J.J., ed., p. 493. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel (1977 b)
- 65) HIRST, J.A., BEVERLEY, P.C.L., KISIELOW, P., HOFFMANN, M.K., OETTGEN, H.F. Ly antigens. Markers of T cell function on mouse spleen cells. J. Immunol. 115, 1555 (1975)
- 66) JANDINSKI, J., CANTOR, H., TADAKUMA, T., PEAVY, D.L., PIERCE, C.W. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: suppressor and helper activities are inherent properties of different T cell subclasses. J. Exp. Med. 143, 1382 (1976)
- 67) EARDLEY, D.D., HUGENBERGER, J., MC VAY-BOUDREAU, L., SHEN, F.W., GERSHON, R.K., CANTOR, H. Immunoregulatory circuits among T cell sets. 1. T helper-cells induce other T cell sets to exert feed-back inhibition. J. Exp. Med. 147, 1106 (1978)
- 68) STANTON, T.H., CALKINS, C.E., JANDINSKI, J., SCHENDEL, D.J., STUTMAN, O., CANTOR, H., BOYSE, E.A. The Qa-1 antigenic system. Relationship of Qa-1 phenotypes to lymphocyte sets, mitogen responses and immune functions. J. Exp. Med. 148, 963 (1978)
- 69) FALKOFF, R.M., DUTTON, R.W. Evidence that con A induces cytotoxicity in the same subclass of T cells as does alloimmunisation. J. Immunol. 118, 1600 (1977)
- 70) FRISCHKNECHT, H., BINZ, H., WIGZELL, H. Induction of specific transplantation immune reactions using anti-idiotypic antibodies. J. Exp. Med. 147, 500 (1978)

- 71) STOUT, R.D., HERZENBERG, L.A. The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. II. Mitogen responsiveness of T lymphocytes bearing the Fc receptor. *J. Exp. Med.* 142, 1041 (1975)
- 72) NIEDERHUBER, J.E., FRELINGER, J.A., DINE, M.S., SHOFFNER, P., DUGAN, E., SHREFFLER, D.C. Effects of anti-Ia sera on mitogenic responses. II. Differential expression of the Ia marker on phytohemagglutinin- and concanavalin A-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 143, 372 (1975)
- 73) AHMANN, G.B., SACHS, D.H., HODES, R.J. Requirement for an Ia-bearing accessory cell in concanavalin A-induced T cell proliferation. *J. Immunol.* 121, 1981 (1978)
- 74) YAMASHITA, U., SHEVACH, E.M. The functional expression of Ia antigens on T lymphocytes and macrophages in the guinea pig. In: *Ir Genes and Ia Antigens*, Mc Devitt, H.O., ed., p. 175. Academic Press, New York (1978)
- 75) RYAN, J.L., HENKART, P.A. Inhibition of lymphocyte mitogenesis by immobilized antigen-antibody complexes. In: *Leukocyte Membrane Determinants Regulating Immune Reactivity*, Proc. 10th Leuk. Cult. Conf., Eijssvoegel, V.P., Roos, D., Zeijlemaker, W.P., eds., p. 119. Academic Press, New York (1976)
- 76) SAKANE, T., GREEN, J. Protein A from *Staphylococcus aureus* - A mitogen for human T lymphocytes and B lymphocytes but not L lymphocytes. *J. Immunol.* 120, 302 (1978)
- 77) AUGUST, C.S., MERLER, E., LUCAS, D.O., JANEWAY, C.A. The response in vitro of human lymphocytes to PHA antigens after fractionation on discontinuous density gradients of albumin. *Cell. Immunol.* 1, 603 (1970 b)

- 78) SHEK, P.N., CHOU, C.T., DUBISKI, S., CINADER, B. Rabbit lymphoid cells. I. T cell mitogens, cell volume and adherence properties as probes for cellular heterogeneity. Immunology 30, 549 (1976)
- 79) SHORTMAN, K., BYRD, W., CEROTTINI, J.C., BRUNNER, K.T. Characterization and separation of mouse lymphocytes and subpopulations responding to phytohemagglutinin and pokeweed mitogen. Cell. Immunol. 6, 12 (1973)
- 80) KELLY, J.P., WEDNER, H.J., PARKER, C.W. Mitogenic receptors on human peripheral blood lymphocytes: The interaction of Phaseolus vulgaris erythroagglutinating phytohemagglutinin and anti-thymocyte globulin on the human peripheral blood lymphocyte membrane. J. Immunol. 118, 2231 (1977)
- 81) REISNER, Y., LINKER-ISRAELI, M., SHARON, N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. Cell. Immunol. 25, 129 (1976)

Herrn Privatdozent Dr. Rudolf Elfe danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für seine wertvollen Hinweise und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Maria de Tavera danke ich für die freundliche Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Lebenslauf

7.7. 1954 Geburt in Heidenheim an der Brenz.
Eltern: Franz Trost, Ingenieur und Margit Trost
geb. Mayer

1960-1965 Besuch der Volksschule in München

1965-1974 Besuch des Städtischen Theodolinden-Gymnasiums
in München

Mai 1974 Reifeprüfung am Theodolinden-Gymnasium

Nov. 1974 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München

Aug. 1976 Ärztliche Vorprüfung

Aug. 1977 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Aug. 1979 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Sept. 1979 Eheschließung mit Diplomingenieur Thomas Tietze

Okt. 1980 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Nov. 1980

